

Estágio num laboratório de análises de águas e efluentes

Relatório de Estágio apresentado para a obtenção do grau de Mestre em
Processos Químicos e Biológicos

Autor

Ana Carolina de Portugal Queiroz

Orientadores

Luís Miguel Moura Neves de Castro

Maria Nazaré Coelho Marques Pinheiro

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Supervisor

Carlos Alberto dos Reis Veras

AEMITEQ – Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade

Coimbra, Dezembro 2015

“Ouve os conselhos que te derem e aceita as correções,
para que sejas sábio todo o resto da tua vida.”

Provérbios 19:20

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste percurso académico estive sempre rodeada de pessoas que me apoiaram e incentivaram a ultrapassar cada desafio que me era proposto. A todas essas pessoas agradeço e dedico-lhes este relatório de estágio.

Primeiramente agradeço à minha família, especialmente aos meus pais por todo o amor, paciência e dedicação porque sem eles não seria possível ser o que sou hoje.

Agradeço especialmente ao meu namorado, José Silva, por todo o amor incondicional e por todos os momentos de felicidade que durante todos estes anos me proporcionaste. O teu amor, a tua paciência e a tua dedicação foram, são e serão uma parte muito importante na minha vida, sem ti nada disto seria possível. Muito Obrigado!

Agradeço aos meus amigos por todo o apoio e carinho durante este percurso académico.

Agradeço aos meus orientadores, Luís Miguel Castro e Maria de Nazaré Pinheiro, por todo o apoio e disponibilidade ao longo do meu percurso académico e em especial na realização deste relatório de estágio.

Agradeço ao meu supervisor na AEMITEQ, Carlos Veras, por toda a paciência, disponibilidade e partilha de conhecimento ao longo deste estágio. Mas acima de tudo, por sempre acreditar nas minhas capacidades e me incentivar a ultrapassar cada desafio. Obrigado!

Agradeço à AEMITEQ por me ter recebido tão bem na empresa, especialmente à equipa do laboratório da AEMITEQ pela disponibilidade, apoio e pelos momentos de convívio.

E, por último, mas igualmente importante, agradeço a DEUS pela sabedoria, concentração e serenidade.

RESUMO

Este relatório de estágio foi elaborado no âmbito da unidade curricular dissertação/projeto/estágio do Mestrado em Processos Químicos e Biológicos no Departamento de Engenharia Química e Biológica (DEQB) no Instituto Superior de Engenharia de Coimbra (ISEC).

O presente relatório reflete o estágio que decorreu na Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade (AEMITEQ), um laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) cuja atividade principal consiste na realização de análises físico-químicas de águas, efluentes e solos, entre outros.

O principal objetivo deste estágio consistiu na revalidação e na estimativa da incerteza de acordo com a norma ISO 11352:2012 do procedimento laboratorial: “Método de Análise de Azoto Amoniacal em Águas”. A proposta de revalidação de um método teve origem na alteração no modo de identificação dos documentos normativos nos anexos técnicos de acreditação. Em consequência desta alteração houve a necessidade de evidenciar perante o IPAC que o método em questão permanecia validado. A necessidade de estimar a incerteza de acordo com a norma ISO 11352:2012 teve origem na suspensão do guia do IPAC - OGC007, uma vez que a incerteza estimada pelo laboratório baseava-se neste guia. Estes objetivos foram realizados com sucesso.

Outro dos objetivos deste estágio consistiu na integração nas atividades correntes do laboratório e na familiarização e execução das técnicas analíticas adotadas pela AEMITEQ com supervisão, tanto no âmbito da acreditação como fora do âmbito da acreditação. Este objetivo foi concretizado com sucesso, uma vez que obtive qualificação em vários ensaios acreditados. De uma forma generalizada, o estágio permitiu a integração num ambiente empresarial, designadamente num laboratório acreditado como a AEMITEQ.

Desta forma, é possível concluir que o estágio foi realizado com sucesso, uma vez que no final fui convidada a realizar estágio profissional na AEMITEQ.

ABSTRACT

This internship report was carried out as part of the curricular unit dissertation/project/internship of a Master Degree in Chemical and Biological processes at the chemical and biological engineering department in Instituto Superior de Engenharia de Coimbra (ISEC).

The internship took place at Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade (AEMITEQ), a laboratory accredited by IPAC (the Portuguese Institute for Accreditation) that carries out physical and chemical analyses of water, wastewater and soil, among others.

The main goal of this internship was the revalidation and uncertainty estimation of the laboratory procedure "Analytical Method of Ammonium in Water" according to the norm ISO 11352:2012. The revalidation proposal of the method was originated by the alteration in the way normative documents are identified in the technical annexes of accreditation. As a result, it was necessary to demonstrate to IPAC that the aforementioned method was still valid. The suspension of IPAC's Guide - OGC007 was at the origin of the need to estimate the uncertainty according to the norm ISO 11352:2012 as the uncertainty estimated by the laboratory was based on this guide. These goals were successfully achieved.

This internship also aimed at the integration in the daily laboratory activities and at the familiarisation and implementation of analytical techniques adopted by AEMITEQ under supervision, both in and outside the scope of accreditation. This goal was successfully achieved as I qualified in several accredited methods. Overall, the internship allowed the integration in a business atmosphere provided by the accredited laboratory AEMITEQ.

It is possible to say that the internship was deemed a success as I was invited to do a professional internship at AEMITEQ at the end.

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Compostos azotados em águas	3
1.2	Motivação	5
1.3	Descrição da Empresa	5
1.4	Estágio	8
1.5	Organização do relatório de estágio	8
2	Método de Análise de Azoto Amoniacal	11
2.1	Método colorimétrico – Nesslerização	11
2.1.1	Método com Destilação	11
2.1.2	Método Colorimétrico	12
2.1.3	Interferências	13
2.2	Outros métodos	13
2.2.1	Método Titulométrico	13
2.2.2	Método colorimétrico – método do indofenol	14
3	Equipamento – Espectrofotómetro	15
4	Parte experimental	19
4.1	Equipamento e Material	19
4.2	Procedimento de lavagem antes da análise	19
4.3	Reagentes	19
4.4	Preparação das soluções padrão	20
4.4.1	Preparação dos padrões da curva de calibração	20
4.4.2	Preparação dos padrões de controlo	20
4.5	Preparação da amostra	21
4.5.1	Método com Destilação	21
4.5.2	Método direto	21

5 Validação do Método	23
5.1 Processo de validação por avaliação indireta	23
5.1.1 Determinação da especificidade/seletividade do método.....	24
5.1.2 Determinação dos limiares analíticos do método.....	26
5.1.3 Determinação da gama de trabalho/linearidade do método.....	28
5.1.4 Determinação da sensibilidade do método.....	33
5.1.5 Determinação da precisão do método.....	34
5.1.6 Determinação da robustez do método.....	40
5.1.7 Determinação da incerteza do método.....	40
5.1.8 Determinação da exatidão do método.....	40
5.2 Processo de validação por avaliação direta	41
5.2.1 Materiais de Referência Certificados (MRC).....	41
5.2.2 Ensaio interlaboratoriais.....	41
5.2.3 Testes Comparativos.....	44
6 Incertezas	45
6.1 Abordagem passo-a-passo	46
6.2 Abordagem supra-analítica	47
6.3 Abordagem supralaboratorial.....	47
6.3.1 Estimativa da incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório.....	48
6.3.2 Estimativa da incerteza associada ao bias do método e do laboratório.....	55
6.4 Incerteza combinada e expandida	61
7 Controlo de Qualidade Interno.....	63
7.1 Curva de Calibração/Padrões de controlo	63
7.2 Brancos.....	65
7.3 Limiares Analíticos.....	66
7.4 Duplicados.....	67
7.5 Ensaio de Recuperação.....	67
7.6 Cartas de Controlo	68

8 Outras atividades realizadas ao longo do estágio.....	71
8.1 Métodos acreditados.....	71
8.2 Métodos não acreditados.....	74
9 Conclusão	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Logotipo de AEMITEQ. (AEMITEQ, 2015a)	6
Figura 1.2 - Localização da AEMITEQ. (AEMITEQ, 2015a)	6
Figura 3.1 - Célula de 1cm. (Lemos, et al., 2009)	16
Figura 3.2 - Percurso ótico do espectrofotómetro de duplo feixe. (adaptado de (Owen, 2000)).....	17
Figura 3.3 - Percurso ótico do espectrofotómetro de feixe simples. (adaptado de (Owen, 2000))	18
Figura 5.1 – Representação gráfica dos ensaios de recuperação obtidos ao longo do tempo.	25
Figura 5.2 - A) Exemplo de uma curva de calibração obtida na gama de trabalho de método instrumental (modelo não linear) com as características do método identificadas. B) Exemplo de uma curva de calibração em que a concentração é representada graficamente em função da concentração medida (modelo linear) (adaptado de (Eurachem, 2014))	29
Figura 5.3- Curva de Calibração utilizada no Teste de Mandel.	32
Figura 5.4 – Representação gráfica dos declives obtidos ao longo do tempo.	34
Figura 5.5 - Escala de pontuação utilizada na avaliação do factor de desempenho Z (“Z-score”) (adaptado de (RELACRE, 1996b))	43
Figura 6.1 - Diferença entre o erro e incerteza. (adaptado de (RELACRE, 1996b))	45
Figura 6.2 – Representação gráfica da amplitude relativa dos duplicados no método direto ao longo do tempo..	49
Figura 6.3 – Representação gráfica da amplitude relativa dos duplicados no método com destilação ao longo do tempo.....	49
Figura 6.4 – Representação gráfica dos padrões de controlo 0,15 mgNH ₄ ⁺ /L no método direto ao longo do tempo.	51
Figura 6.5 – Representação gráfica do padrão de controlo 1,00 mgNH ₄ ⁺ /L no método direto ao longo do tempo.	51
Figura 6.6 - Representação gráfica dos padrões de controlo 0,15 mgNH ₄ ⁺ /L no método com destilação ao longo do tempo.....	53
Figura 6.7 - Representação gráfica dos padrões de controlo 1,00 mgNH ₄ ⁺ /L no método com destilação ao longo do tempo.....	53
Figura 6.8 - Representação gráfica dos padrões de controlo 0,50 mgNH ₄ ⁺ /L no método com destilação ao longo do tempo.....	54
Figura 7.1 – Representação gráfica do erro relativo dos padrões de controlo 0,15 mgNH ₄ ⁺ /L, e 1,00 mgNH ₄ ⁺ /L no método direto ao longo do tempo.	64
Figura 7.2 - Representação gráfica do erro relativo dos padrões de controlo 0,15 mgNH ₄ ⁺ /L, 0,50 mgNH ₄ ⁺ /L e 1,00 mgNH ₄ ⁺ /L no método com destilação ao longo do tempo.....	65
Figura 7.3- Representação gráfica do branco no método direto e no método com destilação ao longo do tempo.	66
Figura 7.4 - Exemplo de uma carta de controlo de médias ou indivíduos. (adaptado de (RELACRE, 1996b))	69
Figura 7.5 - Exemplo de uma carta de controlo de amplitudes. (RELACRE, 1996b).....	69
Figura 7.6 - Exemplo de uma carta de controlo de somas cumulativas. (RELACRE, 1996b).....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1- Valores paramétricos de água destinada consumo humano (Decreto - Lei nº 306/2007).	2
Tabela 1.2 – Valores limites de emissão para a descarga de águas residuais (Decreto - Lei nº 236/98).....	4
Tabela 5.1- Valores obtidos dos limites de quantificação.	27
Tabela 5.2 – Valores referentes ao coeficiente de variação e ao erro relativo no primeiro padrão da curva de calibração.	27
Tabela 5.3 – Valores obtidos correspondentes às dez repetições dos padrões de calibração.	31
Tabela 5.4- Valores obtidos no teste da homogeneidade de variâncias.....	31
Tabela 5.5- Resultados obtidos no Teste de Mandel.....	33
Tabela 5.6 – Valores referentes à repetibilidade do método direto e do método com destilação.	36
Tabela 5.7 – Média, desvio padrão, coeficiente de variação e o limite de repetibilidade de cada método.	36
Tabela 5.8 – Valores referentes à reprodutibilidade de cada método.....	38
Tabela 5.9 - Desvio padrão relativo à precisão intermédia no método direto.	39
Tabela 5.10 - Desvio padrão relativo à precisão intermédia no método com destilação.	40
Tabela 5.11 - Valores referentes à determinação do Erro Relativo de cada método.....	43
Tabela 5.12 - Valores referentes à determinação do Z-score de cada método.	43
Tabela 5.13 – Valores da incerteza associada ao valor verdadeiro, da incerteza associada aos resultados do laboratório e o respetivo erro normalizado na destilação.....	44
Tabela 6.1- Valores da amplitude relativa média e o componente da incerteza da carta de controlo de amplitudes no método direto e no método com destilação.	50
Tabela 6.2 - Valores referentes à determinação dos componentes da incerteza associada ao bias do método e do laboratório, no método com destilação.	56
Tabela 6.3 - Valores fornecido pelo fabricante e a respetiva incerteza associada aos erros sistemáticos.....	58
Tabela 6.4 – Valores obtidos nos ensaios de repetibilidade em cada material volumétrico.	59
Tabela 6.5 - Valores referentes aos ensaios experimentais de repetibilidade e a respetiva incerteza.	59

-

SIMBOLOGIA

b_i - Desvios das recuperações em relação à recuperação completa ou à média das recuperações

b_{rms} - *Root mean square* dos desvios das recuperações

C_{ass} - Concentração do valor de referência do ensaio interlaboratorial

C_m - Valor médio referente ao resultado do laboratório no ensaio interlaboratorial

Cv_{pool} - Coeficiente de variação combinado

D_i - Diferença entre o valor reportado pelo laboratório e o valor verdadeiro num ensaio interlaboratorial

D_{rms} - *Root Mean Square* das diferenças entre o valor verdadeiro e o resultado do laboratório

d_2 - Fator utilizado no cálculo do desvio padrão da amplitude média

E_n - Erro Normalizado

E_r - Erro relativo

r - Limite de repetibilidade

R - Limite de reprodutibilidade

\bar{R}_{rel} - Amplitude relativa média

$R_{j,rel}$ - Amplitude Relativa

Si_0 - Desvio padrão da precisão intermédia

S_{Li}^2 - Variância interlaboratorial

$s_{R,i}$ - Desvio padrão da reprodutibilidade

S_{ri}^2 - Variância da repetibilidade.

S_{Ri}^2 - Variância da reprodutibilidade

Sy_x - Desvio padrão residual da função de calibração linear

S_{y_2} - Desvio padrão residual da função de calibração não-linear

U - Incerteza expandida

u_{add} - Incerteza padrão da concentração do analito adicionado

u_b - Componente da incerteza padrão associada aos bias do método e do laboratório

u_c - Incerteza padrão combinada

u_{conc} - Incerteza padrão da concentração da solução adicionada

$u_{\text{Cref},i}$ - Incerteza padrão do valor verdadeiro do ensaio interlaboratorial

\bar{u}_{Cref} - Componente da incerteza média do valor de referência

$u_{\text{r,range}}$ - Componente da incerteza padrão da carta de controlo de amplitudes

u_{Rw} - Componente da incerteza padrão associada à reprodutibilidade intra- laboratório

$u_{\text{Rw,stand}}$ - Componente da incerteza padrão referente aos padrões de controlo

u_v - Componente da incerteza padrão do volume adicionado

$u_{v,b}$ - Componente da incerteza padrão da concentração da solução adicionada ou do volume adicionado associada aos erros sistemáticos

$u_{v,\text{rep}}$ - Componente da incerteza padrão da concentração da solução adicionada ou do volume adicionado associada aos erros aleatórios

Z - *Z-score*

ABREVIATURAS

CV – Coeficiente de Variação

EIL – Ensaio Interlaboratorial

ETA – Estação de Tratamento de Águas

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

IPAC – Instituto Português de Acreditação

LQ – Limite de Quantificação

LD – Limite de Detecção

MR – Material de Referência

MRC – Material de Referência Certificado

MRI – Material de Referência Interno

NP – Norma Portuguesa

PEDIP - Programa Específico para o Desenvolvimento da Indústria Portuguesa

RMS – *Root Mean Square*

1 INTRODUÇÃO

A água é fundamental para a existência de vida no planeta Terra, uma vez que é um dos principais recursos naturais da Terra. Tanto os animais como as plantas dependem da água para sobreviver, no entanto é necessário que a água tenha a qualidade desejada para o fim a que se destina, assegurando o equilíbrio ecológico no planeta. Além do impacto ambiental decorrente da sua poluição, a preocupação com o estado da água prende-se essencialmente com os problemas que a sua contaminação pode induzir na saúde humana. Desta forma, o homem tem necessidade de controlar a qualidade da água, isto é, os parâmetros que permitem avaliar essa condição, de forma a minimizar o impacto no ambiente e na saúde humana.

A água é habitualmente classificada em seis categorias consoante a sua origem e a sua fonte.

Segundo o Decreto-lei 306/2007 de 27 de Agosto, a água de consumo é toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais. Também é considerada água de consumo toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinados ao consumo humano, assim como a água utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada. (Decreto - Lei nº 306/2007)

As águas de consumo tem um controlo extremamente apertado, pois podem influenciar direta ou indiretamente a saúde humana. Desta forma, encontram-se definidos por lei os valores máximos admitidos para diversos parâmetros caracterizadores da qualidade da água de consumo, que permitem controlar e garantir a sua adequabilidade ao consumo humano.

Na Tabela 1.1 encontram-se os valores paramétricos máximos admitidos associados para águas de consumo, definidos pelo Decreto-lei 306/2007 de 27 de Agosto.

Tabela 1.1- Valores paramétricos de água destinada consumo humano (Decreto - Lei nº 306/2007).

Valores paramétricos segundo o Decreto- lei nº306/2007		
Parâmetros	Valores	Unidades
pH	6,5-9,0	Unidades de pH
Condutividade	2500	µS/cm (20°C)
Turvação	4	UNT
Cheiro/Sabor	3	Fator de Diluição (25°C)
Amónio	0,5	mg/L NH ₄
Nitrito	0,5	mg/L NO ₂
Cor	20	mg/L Pt-Co

As águas superficiais provêm de rios ou lagos enquanto que a água subterrânea é toda a água com origem abaixo da superfície da Terra, presente nos aquíferos. A água de nascente é considerada uma água subterrânea que possui requisitos físico-químicos e bacteriológicos apropriados ao consumo humano. Este tipo de águas são consideradas águas naturais próprias para consumo humano, isto é, águas de consumo não tratadas. (Decreto - Lei nº 156/98)

As águas residuais podem ser classificadas em águas residuais domésticas, industriais ou urbanas, consoante a sua origem.

Segundo o Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de Junho, as águas residuais domésticas são as águas residuais de serviços e de instalações residenciais, essencialmente provenientes do metabolismo humano e de atividades domésticas. As águas residuais industriais são as águas residuais provenientes de qualquer tipo de atividade que não podem ser classificadas como águas residuais domésticas, nem sejam consideradas águas pluviais. E por último, as águas residuais urbanas são as águas residuais domésticas ou a mistura destas com águas residuais industriais e/ou com águas pluviais. (Decreto - Lei nº 152/97) Neste tipo de águas é importante controlar parâmetros característicos da carga poluente, como a carência química e bioquímica de oxigénio, os sólidos suspensos totais, o fósforo e o azoto total. (Decreto - Lei nº 236/98)

Apesar de todos os parâmetros analisados serem importantes, o controlo dos valores paramétricos dos compostos azotados na água têm uma grande relevância, pois estes refletem a poluição existente na água.

1.1 Compostos azotados em águas

Os compostos azotados em águas são subdivididas em dois grupos.

Um dos grupos representa as formas reduzidas, nomeadamente o azoto orgânico que pode estar presente na água sob a forma, por exemplo, de proteínas, aminoácidos ou ureia; e o azoto amoniacal. Este último pode estar presente na água sob a forma ionizada (ião amónio - NH_4^+) ou sob a forma não ionizada (amoníaco - NH_3), consoante as condições de pH e temperatura da água. A soma do azoto orgânico e amoniacal presente numa água é designada por azoto Kjeldahl total.

Um segundo grupo de compostos azotados é constituído pelas formas oxidadas, designadamente o nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-).

Os compostos azotados convertem-se uns nos outros mediante as condições em que a água se encontra, sendo por isso essencial que se possa monitorizar a concentração de cada espécie, no sentido de minimizar o impacto que estes compostos poderão causar.

A concentração dos diferentes compostos azotados na água são um indicador do estado da poluição nas águas. Quando a poluição é recente, a água apresenta uma elevada concentração de azoto amoniacal ou orgânico (a forma mais tóxica dos compostos azotados), o que representa perigo para a saúde e para o ambiente.

A presença em excesso de azoto amoniacal na água pode ter um grande impacto no ambiente, uma vez que este composto promove a eutrofização, ou seja, o anormal crescimento de algas e plantas no meio aquático devido ao enriquecimento do meio em nutrientes. Em resultado deste fenómeno, a concentração de oxigénio dissolvido diminui no meio aquático devido ao consumo desproporcionado por parte de consumidores primários que se desenvolvem em excesso decorrente da quantidade exagerada de algas, o que consequentemente provoca a morte e a decomposição de bastantes organismos.

O processo de nitrificação, isto é, a oxidação bioquímica do ião amónio a nitrito pelas bactérias *Nitrosomonas* e posteriormente conversão a nitrato pelas bactérias *Nitrobacter*, implica um consumo de oxigénio dissolvido. Este consumo também pode consequentemente afetar o equilíbrio da água, caso a oxigenação do ambiente aquático seja menor que o oxigénio consumido durante a nitrificação.

De forma a minimizar o impacto ambiental derivado destes compostos, encontram-se definidos pelo Decreto-lei 236/1998 de 1 de Agosto os valores limites de emissão para a descarga de águas residuais dos compostos azotados referidos, permitindo assim controlar e garantir a sua adequabilidade.

Na Tabela 1.2 encontram-se os valores limites de emissão para a descarga de águas residuais de compostos azotados, definidos pelo Decreto-lei 236/1998 de 1 de Agosto.

Tabela 1.2 – Valores limites de emissão para a descarga de águas residuais (Decreto - Lei nº 236/98).

Valores limites de emissão para a descarga de águas residuais, segundo o Decreto- lei nº236/98		
Parâmetros	Valores	Unidades
Azoto total	15	mg/L N
Nitratos	50	mg/L NO ₃
Azoto Amoniacal	10	mg/L NH ₄

O excesso de nitrato na água também tem consequências ao nível da saúde pública. Este composto pode desencadear várias doenças nos seres humanos, nomeadamente a metemoglobinemia e o cancro no estômago. A primeira doença mencionada decorre da transformação de nitrato em nitrito por ação de bactérias que operam durante o processo digestivo, na saliva ou no trato intestinal. O nitrito formado combina com a hemoglobina originando meta-hemoglobina, que não tem capacidade de fixar o oxigénio, impossibilitando o transporte e a absorção do oxigénio necessário para as células. Apesar de não ter sido comprovada a sua relação, suspeita-se que o efeito nocivo dos nitratos ao nível do cancro no estômago se deva à conversão dos nitratos (NO₃⁻) em nitritos (NO₂⁻) no estômago.

O azoto amoniacal não representa um grande perigo para a saúde humana, uma vez que a presença deste composto só é considerada tóxica em concentrações superiores a 200 mg/kg de peso corporal. No entanto, este parâmetro apresenta um valor paramétrico de 0,50 mg NH₄⁺/L, segundo o Decreto de lei nº306/2007. No que diz respeito aos nitritos e aos nitratos, estes apresentam um valor paramétrico de 0,50 mg NO₂⁻/L e 50 mg NO₃⁻/L, respetivamente. (Decreto - Lei nº 306/2007; WHO, 2011)

Além das consequências anteriormente mencionadas, a presença do azoto amoniacal em efluentes também pode ter consequências ao nível económico, uma vez que o tratamento da água ou efluente com elevados teores de azoto amoniacal torna-se difícil e apresenta custos elevados.

O azoto amoniacal pode ser removido por permuta iónica, pela ação de bactérias nitrificantes em sistemas biológicos de tratamento de efluentes (que oxidam esta forma de azoto reduzindo-o a nitrato) ou, ainda, através do aumento de pH da água (favorecendo a conversão do ião amónio em amoníaco) e subsequente borbulhamento com ar para o remover da água.

É, ainda, de referir que a presença de amoníaco na água pode interferir na eficiência do processo de desinfecção, promovendo a formação de nitritos nos sistemas de distribuição ou problemas de cheiro e sabor.

Por estes motivos, os compostos azotados são parâmetros importantes no controlo de qualidade de águas de consumo e residual.

Desta forma, é importante que a determinação da qualidade de uma água ou efluente líquido seja realizada por laboratórios competentes que garantam a qualidade das análises realizadas. Para tal, os laboratórios devem possuir critérios e ferramentas que indiquem que os métodos de ensaio, nas condições em que são executados, possuem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade desejada. Desta forma, deve existir um processo de validação para cada método de ensaio que deve ser concebido e adaptado a cada caso. Dentro do processo de validação de um método, também é importante estimar a incerteza associada ao método, pois este parâmetro indica um intervalo de valores, aos quais o resultado pode dispersar, o que confere às análises realizadas a credibilidade e a qualidade exigidas pelo cliente e pelo próprio laboratório. Este assunto será aprofundado no Capítulo 5 - Validação do Método e no Capítulo 6 - Incertezas. (Furtado, 2012; Baird, 2007; Santos, 2007; Pereira, Régis da Silva, 2004; RELACRE, 2000a)

1.2 Motivação

O presente relatório reporta-se ao estágio realizado em contexto empresarial, no âmbito do Mestrado em Processos Químicos e Biológicos do ISEC (Instituto Superior de Engenharia de Coimbra), que, no segundo ano letivo, proporciona aos alunos a possibilidade de realizarem uma dissertação, um projeto ou um estágio numa entidade externa, normalmente uma empresa industrial ou de serviços.

Desde sempre tive a intenção de frequentar um estágio numa empresa, uma vez que esta opção proporciona a alunos o contato direto com a realidade empresarial, conferindo experiências fora no âmbito escolar. Desta forma, por iniciativa própria, entrei em contato com a AEMITEQ (Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade), que se mostrou disponível para me receber como estagiária no Laboratório Químico.

A supervisão do estágio em questão foi assumida pelo responsável do Laboratório Químico da AEMITEQ, Carlos Alberto dos Reis Veras. No ISEC, o estágio foi co-orientado pelos professores do DEQB do ISEC, Luís Miguel Moura Neves de Castro e Maria Nazaré Coelho Marques Pinheiro.

1.3 Descrição da Empresa

A Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, AEMITEQ, é uma associação sem fins lucrativos, que foi criada a 19 de Outubro de 1990. Inicialmente, a empresa candidatou-se ao PEDIP (programa específico para o desenvolvimento da indústria portuguesa) com o intuito de desenvolver um centro de controlo químico, que foi aprovado em 1992. Através desta iniciativa, a AEMITEQ iniciou as suas funções laboratoriais em 1994.



Figura 1.1 - Logotipo de AEMITEQ. (AEMITEQ, 2015a)

A sua instalação abrange uma área de 1200 m² e situa-se no Complexo Tecnológico de Coimbra, na Rua Coronel Júlio Veiga Simão, no Loreto, conforme se encontra representado na Figura 1.2.

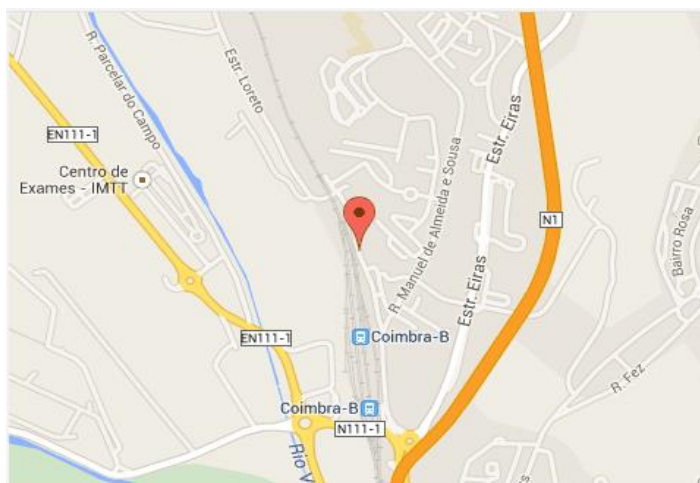


Figura 1.2 - Localização da AEMITEQ. (AEMITEQ, 2015a)

Os laboratórios da AEMITEQ possuem equipamentos que permitem executar ensaios por espectrometria de absorção atómica, por espectrometria de emissão atómica em fonte de plasma, por cromatografia designadamente GC, GC/MS, GC/FTIR, HPLC e de iões. Além disso, também estão devidamente equipados para a execução de análises de química clássica.

Os serviços prestados pela empresa abrangem diversas áreas industriais, nomeadamente a área alimentar, farmacêutica e ambiental.

A AEMITEQ executa análises químicas de matérias-primas, de produtos, de materiais biológicos e de resíduos, industriais e urbanos. Além disso, colabora no controlo da qualidade de águas, nomeadamente águas de consumo, superficiais/subterrâneas, de recreio, residuais, e no funcionamento de várias ETA's e ETAR's. Relativamente às análises de parâmetros microbiológicos, a empresa subcontrata estes ensaios a uma entidade qualificada para tal. A AEMITEQ também efetua ensaios de verificação de compatibilidade de materiais aplicados em transporte e armazenamento de águas de consumo (Ensaio de Migração). A calibração de espectrofotómetros UV-VIS também constitui um dos serviços prestados pela AEMITEQ. (AEMITEQ, 2014b; AEMITEQ, 2015a)

Na AEMITEQ, os laboratórios estão divididos em laboratório químico, cromatografia e de absorção/emissão atômica. No Laboratório químico, onde o estágio decorreu, realizam-se essencialmente análises de química clássica por gravimetria, volumetria, espectrofotometria, potenciometria entre outras técnicas.

A AEMITEQ é um laboratório acreditado pelo IPAC, designadamente pela NP EN ISO/IEC 17025 – uma norma de referência para a acreditação de laboratórios, para os seguintes ensaios:

- Execução de análises em águas de consumo, naturais, industriais e residuais;
- Calibrações de espectrofotómetros de ultravioleta-visível;
- Descrição flexível do âmbito da acreditação com reconhecimento de capacidade para a implementação e validação de metodologias de análise por cromatografia gasosa e líquida, em águas;
- Descrição flexível do âmbito da acreditação com reconhecimento de capacidade para a implementação e validação de metodologias de análise de metais por espectrofotometria de absorção e emissão atômica, em águas. No entanto, esta encontra-se atualmente em suspensão desde 2014;
- Descrição flexível do âmbito da acreditação com reconhecimento de capacidade para a implementação e validação de metodologias de análise de aniões por cromatografia iónica, em águas e efluentes;
- Averiguação de compatibilidade de materiais empregados no transporte e armazenamento de água de consumo (Ensaio de Migração);
- Recolha de amostras de águas de consumo para a análise de parâmetros microbiológicos e físico-químicos (2010). Contudo, atualmente estes procedimentos encontram-se em suspensão voluntária desde 2014;
- Descrição flexível do âmbito da acreditação com reconhecimento de capacidade para a implementação e validação de metodologias de análise de aniões por cromatografia gasosa ligada à espectrometria de massa, em águas e efluentes. (AEMITEQ, 2014b; AEMITEQ, 2015a)

1.4 Estágio

O principal objetivo deste estágio consistiu na revalidação e na estimativa da incerteza de acordo com a norma ISO 11352:2012 de um procedimento laboratorial à minha escolha.

A proposta de revalidação de um método à minha escolha teve origem na circular clientes nº 07/2013 do IPAC que solicitava aos laboratórios a alteração no modo de identificação de documentos normativos nos Anexos Técnicos de Acreditação. Esta alteração consistia em mudar o descritor “Método interno baseado em documento normalizado” para “Método interno” ou “Método interno equivalente a método(s) normalizado(s)”. Tendo em conta as indicações específicas do Anexo 9 do DRC005 – “Procedimento para acreditação de laboratórios”, o método do presente estágio foi considerado método interno. Desta forma, o laboratório teve a necessidade de evidenciar perante o IPAC que o método em questão permanecia validado. Enquanto que a necessidade de estimar a incerteza de acordo com a norma ISO 11352:2012 teve origem na suspensão do guia IPAC “OGC007 - Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos”, uma vez que a incerteza estimada pelo laboratório baseava-se neste guia.

Desta forma, a metodologia escolhida foi o “Método de análise de azoto amoniacal em águas” pelo método colorimétrico – Nesslerização.

Ao longo do presente estágio também realizaram-se diversas técnicas analíticas adotadas pela AEMITEQ, tanto no âmbito da acreditação como fora do âmbito da acreditação. As atividades realizadas ao longo do estágio encontram-se descritas no Capítulo 1 - Outras atividades realizadas ao longo do estágio.

1.5 Organização do relatório de estágio

Este relatório de estágio encontra-se dividido em nove capítulos, cujo conteúdo se encontra descrito de forma sucinta a seguir.

O Capítulo 2 – “Métodos de análise de azoto amoniacal” descreve os fundamentos do método de determinação do azoto amoniacal. Além da descrição pormenorizada do método utilizado no âmbito do estágio, também é efetuada uma breve descrição de outros métodos de análise deste analito.

Após o Capítulo 2, segue-se o Capítulo 3 – “Equipamento-Espectrofotómetro”, onde é explicado o funcionamento do equipamento utilizado na metodologia em estudo, designadamente o espectrofotómetro ultravioleta-visível.

O Capítulo 4 – “Parte experimental” consiste numa descrição detalhada de toda a parte experimental associada à metodologia validada, designadamente o método direto e o método com destilação. Neste capítulo também é mencionada a preparação dos reagentes, dos padrões da curva de calibração e dos padrões de controlo.

Posteriormente, o Capítulo 5 – “Validação do método”, aborda a fundamentação que suporta a validação de métodos, tanto por avaliação direta como indireta, e os respetivos resultados.

No Capítulo 6 – “Incertezas”, é descrito de forma detalhada todo o processo da estimativa da incerteza através da abordagem supralaboratorial, designadamente pela ISO 11352. Além disso, é efetuada uma breve descrição sobre as diferentes abordagens existentes na estimativa de incertezas.

Seguidamente, no Capítulo 7 - “Controlo de Qualidade Interno” é abordada a importância do controlo de qualidade nos métodos de ensaio e as diferentes ferramentas utilizadas para essa finalidade.

Além dos capítulos anteriormente referidos, no Capítulo 8 -“Outras atividades realizadas ao longo do estágio”, faz-se uma breve descrição das atividades realizadas ao longo do estágio na AEMITEQ, para além da revalidação e da estimativa da incerteza do método de análise do azoto amoniacal.

E, por fim, o Capítulo 9 -“Conclusão”, refere-se às conclusões gerais do trabalho realizado na AEMITEQ.

2 . MÉTODO DE ANÁLISE DE AZOTO AMONIAL

O azoto amoniacal pode ser determinado através de vários métodos, nomeadamente através dos métodos colorimétricos – método do indofenol e o método de Nessler, o método titulométrico, entre outros. A escolha do método é baseada em dois importantes fatores: a concentração e a presença de interferências na amostra a analisar.

A aplicação do método colorimétrico – método de Nessler cinge-se a concentrações entre 0,05 a 1,0 mg NH₃-N/L. No caso do método do indofenol, a metodologia é linear até 0,6 mg de NH₃-N/L. No método titulométrico, este abrange uma gama de 1,0 a 25 mg/L. (EPA, 1974; Eaton, et al., 1998)

A determinação do azoto amoniacal durante o presente estágio baseia-se no método colorimétrico – Nesslerização.

2.1 Método colorimétrico – Nesslerização

Normalmente, as águas de consumo apresentam baixas concentrações de azoto amoniacal. Desta forma, o método mais indicado para a determinação deste composto em águas é este método colorimétrico, uma vez que este abrange uma gama entre 0,05 a cerca de 1,0 NH₃-N/L. Este método também é aplicável em águas naturais, de processo e residuais, contudo é necessário realizar previamente uma destilação devido às interferências associadas.

A desvantagem desta metodologia centra-se na dificuldade em eliminar os seus resíduos, designadamente resíduos de mercúrio provenientes do reagente de Nessler. Apesar disso, este método é relativamente rápido e de fácil execução. (Eaton, et al., 1998; Santos, 2007)

2.1.1 Método com Destilação

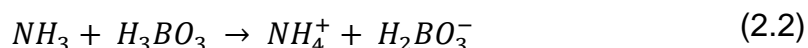
Quando as amostras apresentam interferências, estas são eliminadas através do processo de destilação, permitindo assim a análise da amostra pelo método direto.

O ião amónio (NH₄⁺) em equilíbrio é facilmente convertido em amoníaco (NH₃) (e vice-versa) como demonstrado na Equação (2.1).



O pH influencia de forma significativa a reação da Equação (2.1), por isso quando o pH é superior a 8, o equilíbrio desloca-se para a direita e o amoníaco liberta-se. Desta forma, é necessário adicionar à amostra uma solução de NaOH até obter um pH de 9,5, convertendo assim o ião amónio em amoníaco.

Após transferir a amostra para um balão de destilação é adicionada uma solução de tampão de borato. Este procedimento tem como finalidade manter o pH da amostra a 9,5 e diminuir a hidrólise do cianato e dos compostos orgânicos azotados, o que permite a evolução do amoníaco durante a destilação. Posteriormente, o destilado que passa pelo condensador é recolhido numa solução com ácido bórico a 2% (a ponta do condensador tem de estar imersa na solução de ácido ao longo da destilação), que converte o amoníaco em ião amónio como demonstrado na Equação (2.2).

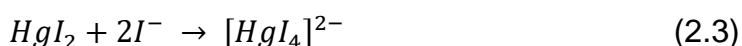


E, por fim o destilado é analisado pelo método colorimétrico. (Kaul, 2002; CETESB, 1978; EPA, 1974; Eaton, et al., 1998)

2.1.2 Método Colorimétrico

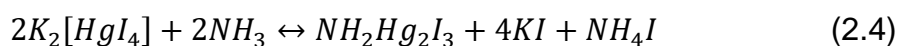
O método colorimétrico foi desenvolvido por Julius Nessler em 1856, sendo este um dos métodos mais antigos para a determinação do azoto amoniacal. Este método analítico consiste em adicionar o reagente de Nessler à amostra para que esta desenvolva cor e seja possível determinar o azoto amoniacal por espectrofotometria. De forma a eliminar alguma turvação presente na amostra, adiciona-se algumas gotas de uma solução tartarato de sódio e potássio antes de adição do reagente de Nessler.

No que diz respeito ao reagente de Nessler, um composto designado de iodeto de mercúrio (II) reage com o excesso de iodeto e forma o complexo tetraiodomercurato (II) (HgI_4) representado pela Equação (2.3).



A solução alcalina do complexo anteriormente mencionado $[HgI_4]^{2-}$ com hidróxido de potássio em excesso forma o reagente de Nessler ($K_2(HgI_4)$).

Se amostra tiver amoníaco na sua composição, após a adição do reagente de Nessler, este reage e forma um composto amarelo acastanhado. Esta reação entre o reagente de Nessler e o amoníaco pode ser representada pela Equação (2.4).



Após a adição do reagente, espera-se cerca de 30 minutos para que a cor se desenvolva nas amostras. Quanto maior for a concentração de azoto amoniacal, maior será a coloração desenvolvida na amostra. Posteriormente, a amostra é analisada no espectrofotómetro com um comprimento de onda de 425nm. (Patnaik, 2003; EPA, 1974; Santos, 2007; Eaton, et al., 1998; Jeffery, et al., 1989)

2.1.3 Interferências

Este método na presença de alguns compostos está sujeito a algumas interferências.

No caso dos compostos orgânicos, nomeadamente as cetonas, os aldeídos, os álcoois, as aminas entre outros compostos, estes podem originar uma cor amarela esverdeada quando se adiciona o reagente de Nessler. Esta interferência, especificamente o formaldeído, pode ser eliminada ao ferver a amostra a um pH baixo (aproximadamente 2 a 3) antes da destilação e da adição do reagente de Nessler.

Relativamente ao cloro residual, este composto também interfere na determinação do azoto amoniacal, por isso é necessário removê-lo antes da destilação adicionando à amostra tiosulfato de sódio.

A Glicina, a ureia, o ácido glutâmico, o cianato e a acetamida hidrolisam-se muito lentamente. No entanto, o cianato (composto presente em efluentes industriais) e a ureia hidrolisam-se durante a destilação a um pH de 9,5, o que eleva a hidrólise da ureia a cerca de 7% e 5% nos cianatos.

Quando as amostras apresentarem alguma turvação, estas podem ser clarificadas com sulfato de zinco (ZnSO_4) em solução de NaOH até um pH próximo de 10,5. Posteriormente, o precipitado de Zn(OH)_2 é filtrado e é analisada a amostra filtrada (rejeitando os primeiros 25 mL). Além disso, a floculação também é um método alternativo para a remoção dos sólidos suspensos. (Eaton, et al., 1998; EPA, 1974; ASTM, 2014)

2.2 Outros métodos

Além do método anteriormente mencionado, o azoto amoniacal também pode ser determinado através do método titulométrico e do método do indofenol (método colorimétrico). Estes métodos serão abordados resumidamente nos subcapítulos seguintes.

2.2.1 Método Titulométrico

O método titulométrico é normalmente utilizado em amostras que tenham uma elevada concentração de azoto amoniacal (1,0 a 25 mg/L). Nesta metodologia é necessário destilar todas as amostras, o que constitui uma desvantagem em relação ao método colorimétrico baseado na reação de Nessler. A destilação no método titulométrico consiste em recolher o destilado da amostra em ácido bórico com um indicador adequado, nomeadamente o indicador misto de vermelho de metila com azul de metileno. Posteriormente, a amostra é titulada com ácido sulfúrico ($[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0,02 \text{ N}$) até se obter uma tonalidade lavanda pálido. (Eaton, et al., 1998; EPA, 1974).

2.2.2 Método colorimétrico – método do indofenol

No método do indofenol, a reação do amoníaco presente na amostra com a solução de fenol, o reagente oxidante (hipoclorito ou o dicloro isocianato de sódio) e o catalisador (nitroprussiato de sódio ou ferrocianeto de potássio) forma um composto com tonalidade azul, o indofenol, que permite a análise por espectrofotometria (640 nm).

Este método depende de vários fatores, nomeadamente da luz, do catalisador, do pH e da temperatura, sendo que este último fator influencia diretamente a velocidade de formação do indofenol. Desta forma, é necessário cobrir a amostra com parafilme e colocá-la numa sala com luz difusa durante cerca de uma hora à temperatura ambiente (22 a 27°C). Por isso, comparativamente com o outro método colorimétrico anteriormente mencionado, esta metodologia demora mais tempo a desenvolver a coloração pretendida, no entanto a coloração é estável durante mais tempo. Além disso, as interferências do método do indofenol são idênticas ao do método baseado na reação de Nessler. Quando este método apresenta interferências também é necessário destilar a amostra, mas com uma solução absorvente de ácido sulfúrico. (Eaton, et al., 1998; Santos, 2007; Kaul, 2002)

3 EQUIPAMENTO – ESPETROFOTÓMETRO

O funcionamento do espectrofotómetro baseia-se no princípio que cada componente químico é capaz de absorver ou transmitir luz num determinado intervalo de comprimento de onda. Desta forma, o espectrofotómetro tem a capacidade de determinar a quantidade de luz absorvida (absorvância) ou transmitida (transmitância) numa amostra, que posteriormente pode ser relacionada com a concentração do componente em análise.

O espectro de radiação é constituído essencialmente pela região do espectro visível, ultravioleta, infravermelho, radio, raio X entre outras regiões. Cada comprimento de onda emite uma frequência que permite aos fótons terem energia suficiente para que ocorram transições entre estados rotacionais, vibracionais ou eletrónicos de uma molécula. Sendo, por isso possível determinar a quantidade de luz absorvida em cada comprimento de onda.

Segundo a lei de *Beer-Lambert*, a quantidade de luz absorvida ou transmitida é proporcional à concentração da solução. Desta forma, a absorvância pode ser representada pela Equação (3.1), em que A é a absorvância, ε é a absorvidade molecular ou o coeficiente de extinção, l é a espessura da amostra onde a luz passa e c é a concentração do soluto.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon lc \quad (3.1)$$

A razão entre a radiação transmitida (I) e a radiação incidente (I_0) é designada de transmitância, como representado na Equação (3.2). A Transmitância varia entre 0 e 1, mas também pode ser designada por percentagem. Se o solvente em análise for totalmente absorvente a transmitância é nula, mas se o solvente for transparente a radiação transmitida é igual à incidente ($I = I_0$).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.2)$$

O espectrofotómetro é constituído por cinco importantes componentes, nomeadamente a fonte de radiação, o monocromador, o compartimento para a amostra, o detetor e o indicador de sinal.

Em relação à fonte de radiação, esta deve emitir todos os comprimentos de onda do espectro de absorção molecular selecionado, deve ser estável e deve ter a intensidade de potência radiante suficiente para que esta seja detetada no espectrofotómetro. Existem vários tipos de fontes de radiação, nomeadamente a lâmpada de filamento de tungsténio, a lâmpada de quartzo-iodo, a lâmpada de descarga de hidrogénio ou deutério, entre outras.

A lâmpada de filamento de tungstênio emite radiação entre os 320 e os 2500 nm. A presença do invólucro de vidro nesta lâmpada condiciona a sua utilização para a região do visível e do infravermelho próximo, uma vez que este absorve toda a radiação emitida abaixo dos 320 nm. Desta forma, a lâmpada de filamento de tungstênio é usualmente utilizada na região do visível e do infravermelho próximo, no entanto a energia emitida é predominante na região do infravermelho próximo. A lâmpada de quartzo-iodo emite radiação entre os 200 e os 3000 nm. Esta lâmpada é semelhante à fonte de radiação anteriormente mencionada, no entanto esta é constituída por um involucro de quartzo-iodo que permite a emissão de radiação na região do ultravioleta. No caso da lâmpada de descarga de hidrogénio ou deutério, esta emite radiação contínua entre os 180 e os 370 nm e é a mais utilizada na região do ultravioleta.

A principal função do monocromador reside na seleção do comprimento de onda. Este é composto por uma fenda de entrada, um elemento de dispersão (um prisma ou uma rede de difração) e uma fenda de saída. Em relação ao monocromador prismático, a radiação proveniente da fonte de radiação entra pela fenda de entrada, incide no prisma e provoca um desvio. Consoante o comprimento de onda selecionado, o desvio provocado toma diferentes direções. No monocromador reticular, este é constituído por uma rede de difração (placa transparente com inúmeras ranhuras paralelas e equidistantes) em que a luz que provém da fonte de radiação sai da rede de difração pela fenda de saída e seleciona apenas uma banda de radiação. Estes monocromadores abrangem todas as regiões do espectro de absorção e, ainda têm uma melhor resolução, o que constitui uma vantagem em relação ao monocromador prismático.

Na Figura 3.1 encontra-se representada uma célula, isto é, o compartimento onde se coloca a amostra. Esta pode ser constituída por vidro ou sílica fundida e ter diferentes dimensões (por exemplo 1 cm ou 4 cm). A utilização dos diferentes tipos de célula varia consoante a região do espectro em análise. Normalmente, as células de vidro (375-2000nm) utilizam-se na região do visível, pois estas tem uma melhor dispersão. No entanto, estas não se aplicam à região do ultravioleta, uma vez que o vidro absorve a radiação ultravioleta. Desta forma, as células mais adequadas para a região do ultravioleta são as células de sílica fundida ou quartzo (150-3000nm). É necessário ter uma especial atenção à limpeza das células para evitar ou eliminar contaminações por pó, gorduras, evaporação do solvente ou outras impurezas que podem diminuir a absorvância da célula.



Figura 3.1 - Célula de 1cm. (Lemos, et al., 2009)

No espectrofotômetro, a luz emitida pela fonte de radiação passa pelo monocromador, que já tem um comprimento de onda selecionado, e atravessa o compartimento (ou célula) com a amostra através de uma fenda à saída do monocromador. Posteriormente, a luz remanescente é detetada pelo detetor que gera um sinal proporcional à quantidade de luz absorvida pela amostra. E por fim, o sinal detetado pelo espectrofotômetro é registrado no indicador de sinal.

Tendo em conta o sistema de operação dos espectrofotômetros, existem dois tipos de espectrofotômetros, nomeadamente o espectrofotômetro de feixe simples e o espectrofotômetro de feixe duplo. No espectrofotômetro de feixe duplo representado na Figura 3.2, o feixe de radiação que provém do monocromador divide-se e atravessa alternadamente o percurso ótico do branco (solução de referência com uma solução não absorvente) e da amostra até ao detetor, várias vezes por segundo. Desta forma, a diferença entre a absorvância da célula de referência e a absorvância da amostra é quantificada, obtendo assim a absorvância correspondente ao componente em análise. Neste tipo de espectrofotômetro, o ajuste de 100 % de transmitância é realizado com o branco nas duas células. Enquanto que no espectrofotômetro de feixe simples representado na Figura 3.3, o feixe de radiação atravessa o percurso ótico da solução do branco numa única célula até o sinal representar 100 % de transmitância. Após este procedimento, a solução de referência é substituída pela amostra e é efetuada uma nova leitura. Os espectrofotômetros de feixe simples têm como vantagens a alta sensibilidade e o baixo custo. (Sommer, 1989; Owen, 2000; Lemos, et al., 2009; Settle, 1997; Willard, et al., 1965)

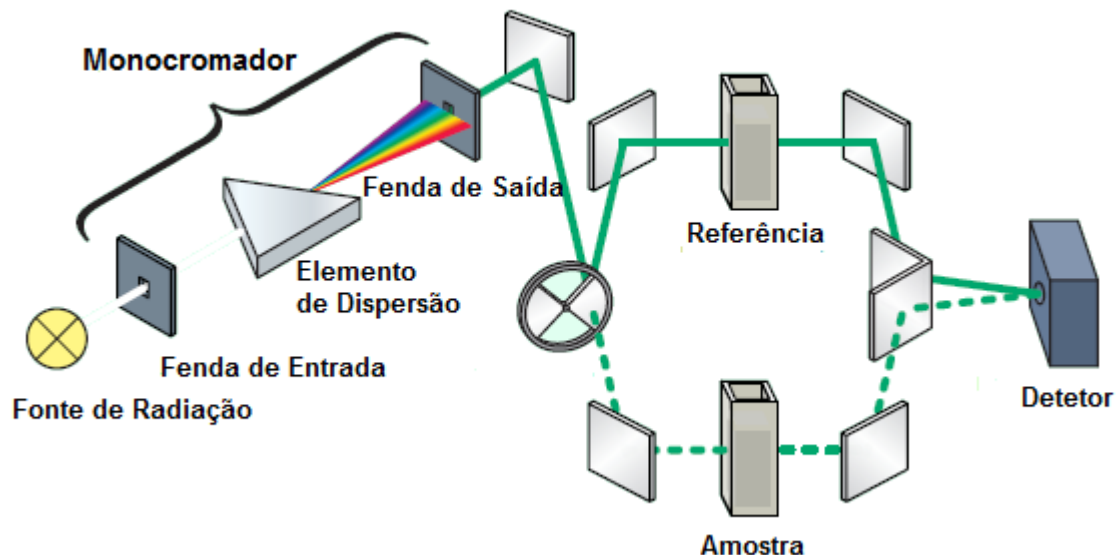


Figura 3.2 - Percurso ótico do espectrofotômetro de duplo feixe. (adaptado de (Owen, 2000))

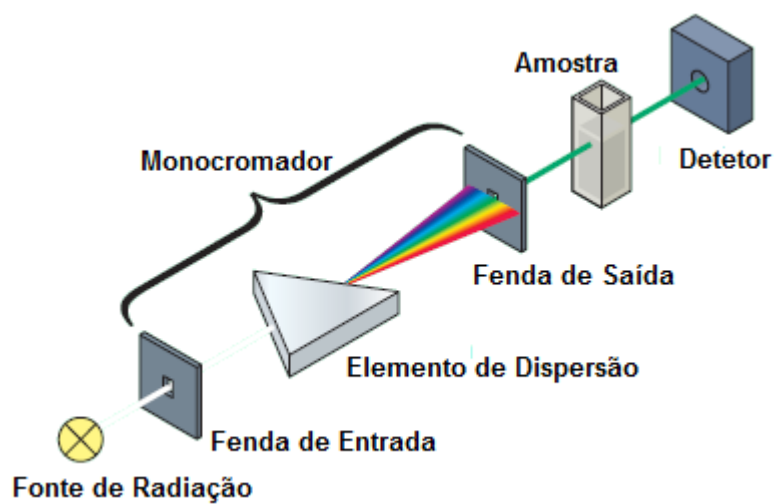


Figura 3.3 - Percurso óptico do espectrofotómetro de feixe simples. (adaptado de (Owen, 2000))

4 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo irá ser descrito de uma forma pormenorizada o procedimento experimental da análise de azoto amoniacal, designadamente o equipamento, os reagentes e as preparações das soluções padrão (controlo e calibração) e da amostra.

4.1 Equipamento e Material

Na realização do método de análise de azoto amoniacal utilizam-se os seguintes equipamentos:

- Balança analítica – KERN 770;
- Espectrofotómetro de ultravioleta visível (com células de 40 mm) – UNICAM UV2;
- Estufa para secar os reagentes – BINDER ED-53;
- Manta de Aquecimento - HORST;
- Medidor de pH – Radiometer Copenhagen PHM250;
- Material volumétrico – *Normax*.

Além do material anteriormente mencionado, no procedimento da destilação utilizam-se balões de destilação (800mL), uma coluna fracionada e uma coluna de refrigeração.

4.2 Procedimento de lavagem antes da análise

No início de cada análise, procede-se à lavagem do material, tanto no método direto como no método com destilação.

De forma a evitar possíveis contaminações durante a destilação, destila-se 150 mL dos 200 mL de uma solução de lavagem constituída por NaOH e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sendo esta diluída (1:1). Após esta etapa, destila-se mais 150 mL dos 200 mL de água bi-desionizada. Como alternativa, o material da destilação também pode ser previamente lavado com uma solução de ácido sulfúrico a 10% e posteriormente com água bi-desionizada. Relativamente ao material volumétrico utilizado na análise, este é enxaguado com uma solução de ácido sulfúrico a 10% e depois com água bi-desionizada.

4.3 Reagentes

Os reagentes utilizados neste método são:

- Tiossulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (CHEM-LAB, 99,5%);
- Cloreto de amónio, NH_4Cl (Panreac, 99,5%);

- Solução reagente de Nessler comercial (Merck);
- Hidróxido de sódio (pastilhas), NaOH (Fisher Chemical, 99,07%);
- Tetraborato de sódio, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, 99,5%);
- Ácido bórico, H_3BO_3 (Fisher Chemical, 100%);
- Sulfato de zinco, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, 99,5 – 103,0%);
- Tartarato de sódio e potássio, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CHEM-LAB, 99,5%).

4.4 Preparação das soluções padrão

As soluções padrão de controlo e da curva de calibração são independentes, isto é, as soluções provêm de lotes ou marcas diferentes.

4.4.1 Preparação dos padrões da curva de calibração

A solução utilizada na curva de calibração pode ser proveniente de uma preparação interna ou de uma solução comercial. A preparação interna consiste numa solução de cloreto de amónio ($1000\text{mgNH}_4^+/\text{L}$). Esta solução mãe é preparada com 2,98 g de NH_4Cl (seco a 110° durante 4 horas) num balão volumétrico de 1000 mL e aferida com água bi-desionizada.

Posteriormente, é necessário preparar uma solução intermédia de $10\text{ mg NH}_4^+/\text{L}$, em que se pipetam 2 mL da solução mencionada anteriormente para um balão volumétrico de 200 mL e se afere com água bi-desionizada.

Após este procedimento, preparam-se 6 padrões de calibração. No primeiro padrão ($0,15\text{ mg NH}_4^+/\text{L}$) pipeta-se 3 mL para um balão de 200 mL e retira-se 50 mL da solução anterior para um balão de 50 mL. Nos restantes padrões de calibração, pipetam-se 1 mL, 2 mL, 4 mL, 5 mL e 7 mL para balões de 50 mL, o que representa uma concentração de $0,20\text{ mgNH}_4^+/\text{L}$, $0,40\text{ mgNH}_4^+/\text{L}$, $0,80\text{ mg NH}_4^+/\text{L}$, $1,0\text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ e $1,4\text{ mg NH}_4^+/\text{L}$, respetivamente. Todas soluções mencionadas são aferidas com água bi-desionizada.

4.4.2 Preparação dos padrões de controlo

Como anteriormente mencionado, a solução mãe dos padrões de controlo é independente dos padrões de calibração, podendo esta ser comercial ou interna. A preparação interna de uma solução com $1000\text{mgNH}_4^+/\text{L}$, consiste em pesar 2,98 g de NH_4Cl (seco a 110° durante 4 horas) para um balão volumétrico de 1000 mL e aferir com água bi-desionizada.

É necessário preparar uma solução intermédia de 10 mg NH_4^+/L , a partir da solução anteriormente referida, em que pipetam 2 mL da solução para um balão volumétrico de 200 mL e se afere com água bi-desionizada. Após esta etapa, preparam-se dois padrões de controlo de 0,15 mg NH_4^+/L e 1,0 mg NH_4^+/L . No primeiro padrão, pipeta-se 3 mL da solução de 10 mg NH_4^+/L para um balão de 200 mL e retira-se 50 mL da solução anterior para um balão de 50 mL. No segundo padrão, pipeta-se 5 mL da solução intermédia para um balão de 50 mL. Ambas as soluções são aferidas com água bi-desionizada.

A preparação de um padrão de controlo destilado com uma concentração de 0,15 mg NH_4^+/L consiste em pipetar 7,5 mL da solução intermédia de controlo para um balão de 500 mL e aferir com água bi-desionizada. Consoante a necessidade, podem ser preparados padrões de controlo com outras concentrações.

4.5 Preparação da amostra

Consoante o tipo de amostra e as possíveis interferências, a análise é realizada pelo método direto ou pelo método com destilação, conforme explicado no subcapítulo 2.1.3 - Interferências.

As amostras de águas residuais apresentam concentrações elevadas, por isso são previamente diluídas (10x no mínimo), permitindo valores de *L.Q.* superiores, nomeadamente 1,5 mg/L.

4.5.1 Método com Destilação

Neste método, antes de proceder à destilação, transfere-se 500 mL para um copo (600 mL) e ajusta-se o pH a 9,5 com NaOH num medidor de pH. Posteriormente, transfere-se a solução para um balão de destilação (800 mL) e adiciona-se 25 mL da solução tampão de borato. Esta solução é destilada para um erlenmeyer de 500 mL, onde a ponta do condensador se encontra mergulhada em 50 mL de solução de ácido bórico a 2%. Após destilar cerca de 400 mL, transfere-se o destilado para um balão de 500 mL e afere-se com água bi-desionizada. Após este procedimento, retira-se 50 mL da solução anteriormente mencionada para um balão de 50 mL e a amostra é tratada como indicado no ponto 4.5.2- Método direto.

4.5.2 Método direto

Inicialmente, transfere-se 50 mL da amostra para um balão de 50 mL. Em seguida, adiciona-se 2 gotas de solução de tartarato de sódio e potássio e 2 mL do reagente de Nessler a todas as amostras, padrões e branco. Após 30 minutos, lê-se a absorvância do branco, dos padrões e das amostras a 425 nm em células de 40 mm. A solução de referência utilizada neste método é a água bi-desionizada.

5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação de um método tem como finalidade confirmar, através de estudos experimentais, que o método tem as condições adequadas para a aplicação requerida. Desta forma, o laboratório assegura a credibilidade dos resultados obtidos no método em questão. Consoante a sua origem, os métodos de ensaio podem dividir-se em duas categorias – Método Normalizado e Método Interno.

O Método Normalizado consiste num método elaborado por uma entidade de normalização, cujos métodos são aceites pela comunidade laboratorial (nacional ou internacional). Estes métodos já estão validados, por isso não é necessário executar todo o processo de validação, desde que não se efetuem alterações significantes. No entanto, o laboratório tem a responsabilidade de averiguar se as características principais do método permanecem com a mesma qualidade, demonstrando assim a credibilidade dos resultados através de registos.

O Método Interno consiste num método elaborado pelo próprio laboratório ou adaptado a partir de métodos que não se baseiam numa norma de ensaio. Também pertencem a esta categoria os métodos que provêm de adaptações ou modificações do conteúdo técnico de normas. Quando um laboratório executar este tipo de método, é necessário haver um processo de validação, que deve ser adaptado a cada caso particular de acordo com o seu grau de exigibilidade. Desta forma, o laboratório garante que o desempenho do método em questão cumpre os requisitos necessários para a análise.

Quando se implementa um novo método ou se efetua alguma modificação/adaptação num método já validado, o laboratório deve validar ou revalidar a metodologia associada. Na validação de um método é necessário realizar um estudo que pode ser efetuado por avaliação indireta, onde se evidenciam as características do método em questão, ou por avaliação direta por comparação com referências aceites. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 2000)

5.1 Processo de validação por avaliação indireta

O processo de validação por avaliação indireta depende do método em questão e é efetuado através da avaliação dos parâmetros característicos do desempenho do método, nomeadamente:

- Especificidade/Seletividade;
- Limites Analíticos;
- Gama de Trabalho;
- Linearidade;
- Sensibilidade;

- Precisão;
- Robustez;
- Incerteza;
- Exatidão.

Desta forma, o laboratório deverá estipular quais os parâmetros que deve incluir no processo de validação, consoante o método em estudo. (RELACRE, 2000a)

5.1.1 Determinação da especificidade/seletividade do método

A seletividade consiste na capacidade que um método possui de reconhecer o analito numa amostra e a um número restrito de interferentes. Enquanto que a especificidade consiste na capacidade que um método possui de detetar um analito específico numa amostra com outros componentes, sem que haja alguma interferência dos outros compostos.

Em relação à especificidade, podem-se comparar análises de amostras contaminadas com uma quantidade de impurezas conhecida ou a amostras não contaminadas. Assim, é possível averiguar se os resultados obtidos não sofrem alterações e garantir que os resultados provêm apenas do analito analisado e que este se distingue dos outros compostos da amostra.

Um aspeto a ter em conta na análise da seletividade é o fato de poder haver mais do que uma forma do componente na amostra, por isso é fundamental definir o analito. Além do aspeto mencionado anteriormente, também é necessário ter em atenção à matriz da amostra, uma vez que esta pode conter compostos que afetam o desempenho do método.

Para avaliar as eventuais interferências na amostra poder-se-ão realizar os seguintes ensaios:

- Comparar um conjunto de amostras com e sem a matriz (maior ou igual a sete), tendo estas as mesmas concentrações do componente nas diferentes concentrações em análise. E, posteriormente realizar o teste F e compará-lo com o valor de F tabelado. Se o valor F for menor, a matriz não interfere significativamente na precisão do método, mas se for maior a matriz já influencia o resultado;
- Comparar os resultados obtidos com outros métodos, quando se desconhecem as interferências;
- Realizar diluições múltiplas das amostras e avaliar se os resultados estão de acordo entre si;
- Realizar vários ensaios de recuperação com amostras de matriz idêntica, com quantidades conhecidas do analito ao longo de toda a gama de trabalho. Verificar se as recuperações obtidas estão de acordo com os critérios de aceitação que o laboratório estipulou. (Eurachem, 2014; RELACRE, 2000a; Silva, et al., 2006)

No método de determinação do azoto amoniacal, a seletividade/especificidade foi avaliada através de ensaios de recuperação.

O ensaio de recuperação (fortificação) consiste em adicionar uma quantidade conhecida de um analito a uma amostra para avaliar a capacidade que um método tem de recuperar o analito adicionado à amostra. Este ensaio é traduzido pela percentagem de recuperação, que indica a quantidade de analito recuperado em termos de percentagem. Esta ferramenta de análise será aprofundada no subcapítulo 7.5 - Ensaios de Recuperação.

A Figura 5.1 apresenta as percentagens de recuperação obtidas (os dados utilizados encontram-se no ANEXO I). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Além disso, a Figura 5.1 também apresenta os critérios de aceitação das percentagens de recuperação (limite superior e inferior) da metodologia em estudo.

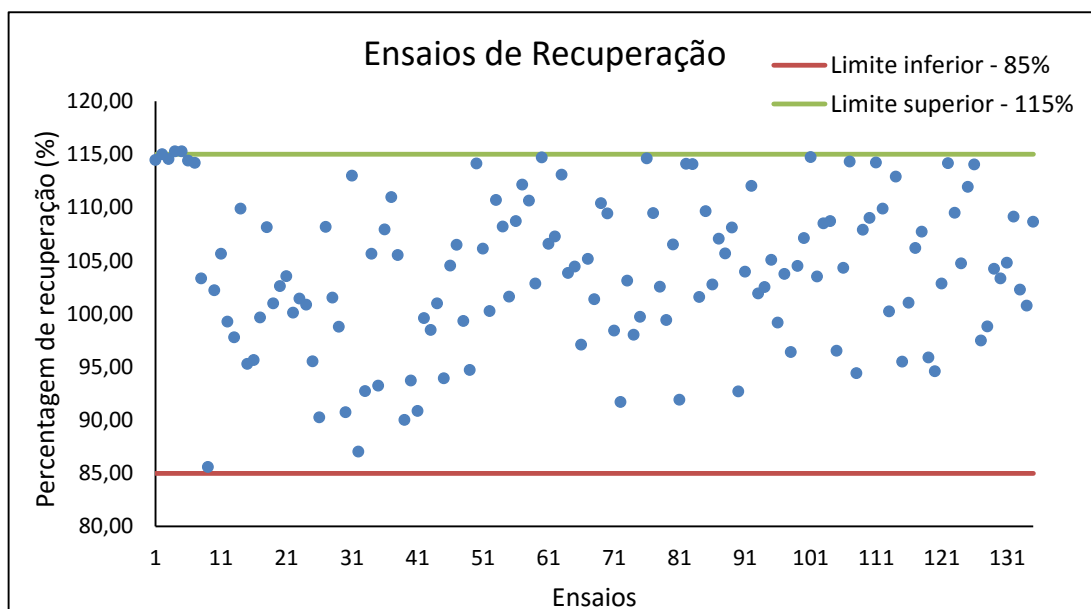


Figura 5.1 – Representação gráfica dos ensaios de recuperação obtidos ao longo do tempo.

Uma vez que as percentagens de recuperação obtidas ao longo do tempo encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório (85% - 115%), constatou-se que a seletividade e a especificidade deste método são aceitáveis, como se pode verificar através da Figura 5.1.

Tendo em conta os dados usados, a percentagem de recuperação deve variar entre o limite inferior de 82,80% e o limite superior de 124,73%, com uma confiança estatística de 99,7 % ($\pm 3\sigma$). Estes limites abrangem os limites estipulados pelo laboratório, por isso é possível concluir que o limite estabelecido está bem estimado. Também foi possível avaliar que as percentagens de recuperação tem um coeficiente de variação de 6,74%.

5.1.2 Determinação dos limiares analíticos do método

Nesta secção apresentam-se a descrição do limite de deteção e do limite de quantificação.

5.1.2.1 Determinação do limite de deteção do método

O limite de deteção (*L.D.*) consiste na menor quantidade do analito que é possível quantificar com uma dada confiança estatística (normalmente 95%). Qualitativamente, este parâmetro indica o limite onde a concentração é distinguível de uma amostra com a mesma matriz mas sem o analito (branco).

Quando uma leitura é inferior a este limiar analítico, não quer dizer que a amostra não contém o analito, mas sim que a concentração do componente em questão se encontra abaixo do limite de deteção, não sendo por isso possível detetar a sua concentração com confiança. Neste caso, apenas é mencionado que a concentração do analito é inferior ao limite de deteção ($< L.D.$).

Quando se efetua uma calibração linear (método dos mínimos quadrados), o limite de deteção é obtido pela Equação (5.1), onde $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da curva de calibração. (IPAC, 2011a; RELACRE, 2000a)

$$L.D. = \frac{[3,3S_{y/x}]}{b} \quad (5.1)$$

5.1.2.2 Determinação do limite de quantificação do método

O Limite de Quantificação (*L.Q.*) consiste na menor quantidade do analito que é possível quantificar com uma precisão e exatidão estatisticamente aceitável. Este limite normalmente corresponde ao início da gama de trabalho, isto é, ao padrão de calibração de menor concentração.

Quando se efetua uma calibração linear (método dos mínimos quadrados), o limite de quantificação pode ser obtido a partir da Equação (5.2), onde $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da curva de calibração. (RELACRE, 2000a; Eurachem, 2014; IPAC, 2011a)

$$L.Q. = \frac{[10S_{y/x}]}{b} \quad (5.2)$$

Na estimativa do limite de quantificação escolheu-se 10 curvas de calibração (0,15 mg NH_4^+/L a 1,40 mg NH_4^+/L), que se encontram representadas no ANEXO II. O limite de quantificação de cada curva de calibração foi determinado através da Equação (5.2).

Na Tabela 5.1 encontram-se os valores utilizados na determinação do limite de quantificação e o respetivo limite de quantificação.

Tabela 5.1- Valores dos limites de quantificação obtidos.

Curva de calibração	$S_{y/x}$	Declive	LQ (mg/L)
1	0,0030	0,50314	0,064
2	0,0038	0,50518	0,077
3	0,0048	0,50765	0,132
4	0,0032	0,49808	0,048
5	0,0037	0,49794	0,106
6	0,0047	0,50739	0,128
7	0,0036	0,50511	0,082
8	0,0027	0,49592	0,065
9	0,0021	0,49333	0,040
10	0,0044	0,49768	0,138

Como seria expetável, os limites de quantificação obtidos na Tabela 5.1 são inferiores ao primeiro padrão da curva de calibração (0,15 mgNH₄⁺/L).

Após a estimativa do limite de quantificação, também é necessário avaliar se este limite em termos de precisão e exatidão é aceitável. Esta avaliação é realizada através da análise de vários padrões perto do limite de quantificação em condições de precisão intermédia, normalmente o padrão de calibração de menor concentração. Estes padrões deverão ter um coeficiente de variação igual ou inferior a 10% para o limite de quantificação ser considerado estatisticamente aceitável. (RELACRE, 2000a)

Com o intuito de averiguar se este limite em termos de precisão e exatidão é aceitável, determinou-se o coeficiente de variação e o erro relativo do padrão de controlo de 0,15 mgNH₄⁺/L. Os dados referentes ao padrão de controlo utilizado encontram-se representados no ANEXO I. Saliento que as análises foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio.

A Tabela 5.2 apresenta os valores referentes à avaliação do limite de quantificação em termos de precisão e exatidão.

Tabela 5.2 – Valores referentes ao coeficiente de variação e ao erro relativo no primeiro padrão da curva de calibração.

Método	CV (%)	ER (%)
Direto	5,61	1,95

Pela análise da Tabela 5.2, verifica-se que tanto o coeficiente de variação (avaliação da precisão) como o erro relativo (avaliação da exatidão) são inferiores a 10%. Desta forma, pode-se considerar validado o limite de quantificação, uma vez que os valores reportados neste limite são estatisticamente confiáveis.

Os limites de detecção e quantificação devem ser verificados sempre que haja alteração dos reagentes, do analista, do equipamento ou quando se faz uma nova curva de calibração. Nestes limiares analíticos, devem-se indicar a expressão "inferior a x mg/l" nas análises que indiquem resultados inferiores ao limite de detecção e quantificação. (RELACRE, 1996b; RELACRE, 2000a)

5.1.3 Determinação da gama de trabalho/linearidade do método

Nesta secção apresenta-se a forma como se determinam a gama de trabalho e a linearidade do método analítico em estudo.

Na determinação da gama de trabalho e da linearidade pode-se utilizar um método constituído por três etapas.

A primeira etapa tem como objetivo identificar onde a curva de calibração é linear e onde se situa o limite inferior e superior da gama de trabalho. Este passo consiste em passar sete ou mais vezes o branco com concentrações diferentes do analito preparados de forma independente e representar graficamente as concentrações do componente em função da sua resposta.

A segunda etapa consiste na determinação da gama de trabalho e da comprovação da sua linearidade. Para tal, passa-se sete ou mais vezes materiais de referência com diferentes concentrações, na zona onde a curva de calibração é linear e representa-se graficamente as concentrações do analito em função da sua resposta.

E a última etapa, tem como finalidade a determinação do limite inferior da gama de trabalho, ou seja, o limite de quantificação ($L.Q$). Nesta etapa, passa-se sete vezes o branco da amostra com concentrações diferentes do analito, próximo do limite de detecção, permitindo assim determinar a concentração mais baixa do analito com um nível de incerteza aceitável. (Silva, et al., 2006)

5.1.3.1 Determinação da gama de trabalho do método

A gama de trabalho é o intervalo entre a concentração mais baixa e a mais elevada. Sendo que a concentração mais baixa normalmente corresponde ao limite de quantificação e a concentração mais alta corresponde à concentração em que são observadas anomalias significativas na sensibilidade analítica, ou seja, é o intervalo durante o qual o método dá resultados com uma incerteza aceitável. Para avaliar se o método pode ser utilizado na gama de trabalho é necessário considerar tanto a linearidade quanto o procedimento de calibração do método.

Durante a validação da gama de trabalho do equipamento, é necessário em primeiro confirmar a relação entre a resposta do aparelho e a respetiva concentração (linear, curvilínea entre outras). Depois deve-se demonstrar que a gama de trabalho do aparelho é compatível com o método e, por último, deve ser verificado se o procedimento de calibração do aparelho é adequado.

Na avaliação da gama de trabalho de um método devem-se cumprir os seguintes requisitos:

- As amostras com concentrações conhecidas e o branco devem estar disponíveis;
- As amostras utilizadas devem ser retiradas ao longo de todo o processo de medição;
- As concentrações das amostras devem abranger toda a gama de trabalho;
- O aparelho deve estar calibrado de acordo com o procedimento de calibração.

Relativamente à Figura 5.2- A), esta representa um exemplo de uma curva de calibração da gama de trabalho com um método instrumental, em que a concentração do padrão é representada graficamente em função do sinal de um equipamento. No caso da Figura 5.2 -B), esta representa um exemplo de uma curva de calibração correspondente à gama de trabalho de um método, em que a concentração de uma amostra conhecida é representada graficamente em função da concentração medida. A curva de calibração de uma gama de trabalho também é avaliada em modelos lineares (norma ISO 8466-1) e em modelos não lineares (norma ISO 8466-2). A Figura 5.2 - A) e B) representam um modelo não linear e linear, respetivamente. (Eurachem, 2014)

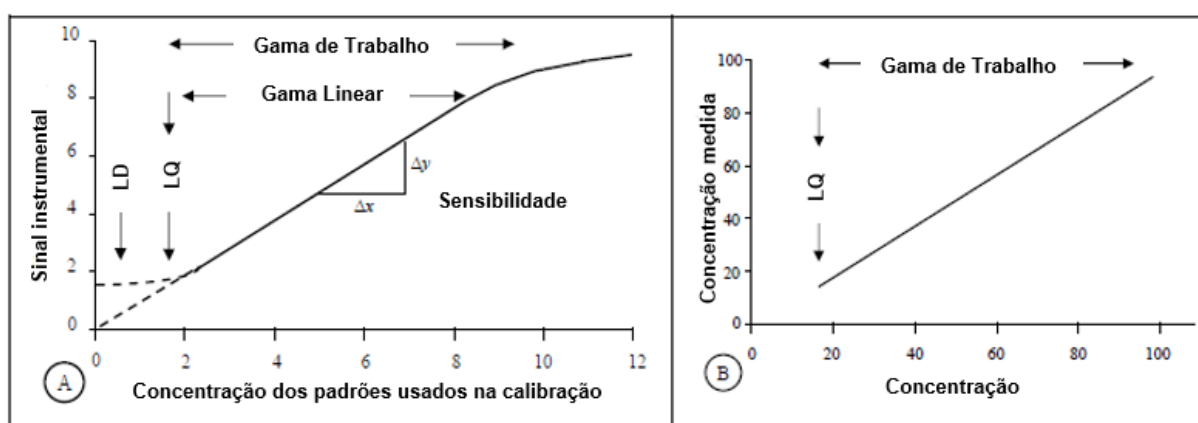


Figura 5.2 - A) Exemplo de uma curva de calibração obtida na gama de trabalho de método instrumental (modelo não linear) com as características do método identificadas. B) Exemplo de uma curva de calibração em que a concentração é representada graficamente em função da concentração medida (modelo linear).(adaptado de (Eurachem, 2014))

Quando um método é realizado com base numa curva de calibração, realiza-se o teste de homogeneidade das variâncias para estudar a gama de trabalho.

Na avaliação da gama de trabalho num método que utiliza modelos de calibração linear é recomendado pela ISO 8466-1 medir dez padrões de calibração, devendo existir pelo menos cinco padrões. Estes devem ser distribuídos igualmente ao longo da gama de trabalho.

No teste de homogeneidade de variâncias, devem ser realizadas dez leituras em dez réplicas independentes, para o padrão de calibração de menor (x_1) e de maior (x_{10}) concentração, isto é, os padrões que apresentam maiores variâncias, obtendo-se assim 10 valores da variável medida (y_{ij}). As variâncias correspondentes a estes padrões (S_1^2 e S_{10}^2) são obtidas através das Equações (5.3) e (5.4).

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (5.3)$$

Em que,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (5.4)$$

Onde i é o número do padrão (neste caso entre 1 e 10) e j é número de repetições realizadas em cada padrão.

Para averiguar se existem diferenças significativas entre as variâncias nos limites da gama de trabalho, é determinado o valor teste PG através da Equação (5.5).

$$\begin{cases} PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2 \\ PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2 \end{cases} \quad (5.5)$$

Posteriormente, compara-se o valor tabelado para a distribuição de F para $n-1$ graus de liberdade, com o valor teste de PG determinado através da Equação (5.5). Quando $PG \leq F$, a gama de trabalho está bem ajustada e a diferença entre as duas variâncias não é significativa. Mas se $PG > F$, a diferença entre as variâncias (primeiro e último padrão) é significativa e a gama de trabalho deve ser ajustada até que esta diferença deixe de ser significativa e o valor de PG seja menor (ou igual) que o valor de F. (ISO, 1990a; ISO, 2001b; RELACRE, 2000a; Eurachem, 2014)

A metodologia em estudo apresenta apenas uma gama de trabalho (0,15 mg NH_4^+/L a 1,40 mg NH_4^+/L), apesar de haver dois métodos de análise, e é constituída por seis padrões de calibração.

Para averiguar a homogeneidade de variâncias, realizaram-se dez repetições do padrão de calibração mais baixo (0,15 mg NH_4^+/L) e dez do padrão de calibração mais alto (1,40 mg NH_4^+/L) da gama de trabalho.

A Tabela 5.3 apresenta os valores das dez repetições dos padrões de calibração mencionados, em que x_i é a concentração dos padrões de calibração e y_i é o respetivo sinal instrumental.

Tabela 5.3 – Valores obtidos correspondentes às dez repetições dos padrões de calibração.

x_i (mgNH ₄ ⁺ /L)	$y_{i,1}$	$y_{i,2}$	$y_{i,3}$	$y_{i,4}$	$y_{i,5}$	$y_{i,6}$	$y_{i,7}$	$y_{i,8}$	$y_{i,9}$	$y_{i,10}$
0,15	0,109	0,115	0,111	0,102	0,105	0,110	0,104	0,109	0,108	0,107
0,20	0,123									
0,40	0,224									
0,80	0,429									
1,00	0,536									
1,40	0,749	0,752	0,755	0,755	0,752	0,750	0,754	0,751	0,745	0,747

Com base dos valores obtidos na Tabela 5.3, determinou-se as variâncias através das Equações (5.3) e (5.4). Após a determinação das respetivas variâncias, realizou-se o valor do teste PG através da Equação (5.5) e efetuou-se o teste de homogeneidade de variâncias conforme anteriormente indicado.

A Tabela 5.4 apresenta os valores obtidos no teste de homogeneidade de variâncias.

Tabela 5.4- Valores obtidos no teste da homogeneidade de variâncias.

Parâmetros	Resultados
Variância S_1^2	1,40E-05
Variância S_6^2	1,11E-05
PG	1,26
Fcrítico (95%)	3,18
Fcrítico (99%)	5,35

Pela análise da Tabela 5.4, verifica-se que o PG é menor que o F tabelado, independentemente do grau de confiança. Por isso, é possível afirmar que a gama de trabalho deste método está bem ajustada e que a diferença entre as variâncias do primeiro e do último padrão de calibração não é significativa.

5.1.3.2 Determinação da linearidade do método

A linearidade consiste na capacidade que um método tem de demonstrar que os valores obtidos são diretamente proporcionais à concentração do componente na amostra, dentro de uma gama de trabalho.

A análise da linearidade de um método pode ser feita através da avaliação do coeficiente de correlação da curva. Relativamente à metodologia em estudo, o coeficiente de correlação deve ser maior ou igual que 0,995. (RELACRE, 2000a; AEMITEQ, 2014/2015c)

Um coeficiente de correlação maior ou igual que 0,995, não garante que linearidade está bem ajustada, também é necessário uma avaliação visual da representação gráfica da gama de trabalho.

Além disso, para proceder à avaliação da linearidade, pode-se realizar o *Teste de Mandel* (ou *Teste de Fisher-Snedecor*) - método estatístico descrito na norma ISO 8466. Este teste compara as funções de calibração linear (ISO 8466-1) e não linear (ISO 8466-2) e os respetivos desvios padrão residuais ($S_{y/x}$ e S_{y_2} respetivamente). A diferença das variâncias é determinada através da Equação (5.6), onde N corresponde ao número de padrões de calibração.

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y_2}^2 \quad (5.6)$$

Para analisar a linearidade do método, compara-se o valor tabelado da distribuição F com o valor de PG através da Equação (5.7).

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2} \quad (5.7)$$

Quando $PG \leq F$, a função de calibração é linear e quando $PG > F$, a função de calibração é não linear, devendo ser estudada a hipótese de ajustar a gama de trabalho para uma função de calibração linear. Se tal não for possível, deve-se ajustar com uma função de calibração não linear.

Se a gama de trabalho estiver definida em referência bibliográfica, pode não existir a necessidade de avaliá-la. Desta forma, apenas é necessário analisar a linearidade da curva de calibração do método através da sua representação gráfica e do coeficiente de correlação. (Silva, et al., 2006; ISO, 1990a; ISO, 2001b; RELACRE, 2000a)

A Figura 5.3 apresenta a curva de calibração utilizada no *Teste de Mandel*.

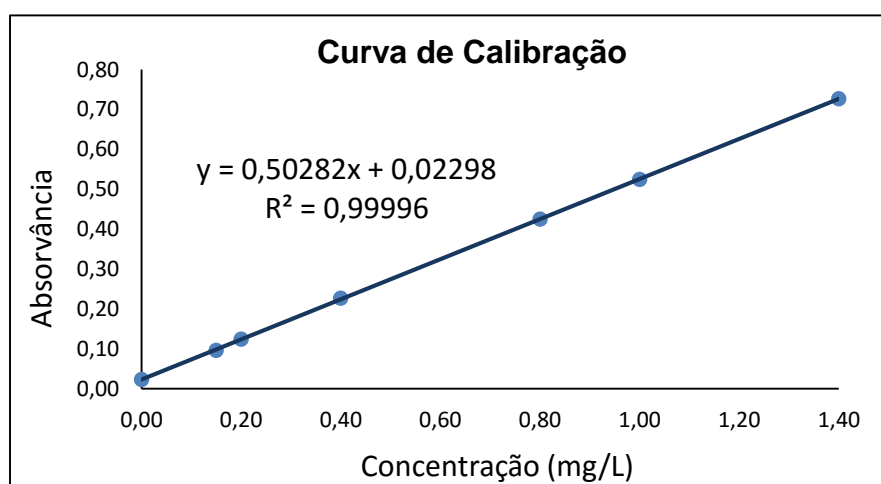


Figura 5.3- Curva de Calibração utilizada no *Teste de Mandel*.

Analisando a Figura 5.3, verifica-se visualmente que a curva de calibração é linear e que o coeficiente de correlação é maior que 0,995, mais precisamente 0,99996.

Em relação ao *Teste de Mandel*, este foi determinado através das Equações (5.6) e (5.7).

A Tabela 5.5 apresenta os valores obtidos no *Teste de Mandel*.

Tabela 5.5- Resultados obtidos no *Teste de Mandel*.

Parâmetros	Resultados
$S_{y/x}$	0,00173
S_y	0,00190
DS^2	6,502E-07
PG	0,18
$F_{crítico} (95\%)$	7,71
$F_{crítico} (99\%)$	21,20

Uma vez que os resultados obtidos no *Teste de Mandel* (Tabela 5.5) indicam que $PG \leq F$ crítico, torna-se evidente que a curva de calibração ajusta-se melhor numa função linear ($y = a + bx$) do que numa função não-linear. Desta forma, é possível concluir que a reta de calibração é linear.

5.1.4 Determinação da sensibilidade do método

A sensibilidade consiste no menor valor de concentração necessário para o método (ou equipamento) detetar uma variação do valor lido. Este parâmetro pode ser obtido através da Equação (5.8).

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (5.8)$$

Este parâmetro depende das características do componente e da técnica de deteção utilizada. No caso da função de calibração ser linear, a sensibilidade é constante em toda a gama de trabalho e idêntica ao declive da reta de calibração. E no caso da função de calibração ser não linear, a sensibilidade (y) pode ser determinada através da equação $y = 2cx + d$. O valor da sensibilidade normalmente é utilizado para comparar a sensibilidade de vários métodos analíticos e de vários componentes. Além disso, também permite avaliar a evolução da sensibilidade ao longo do tempo. (RELACRE, 2000a)

No subcapítulo 5.1.3 – Gama de Trabalho/Linearidade, ficou evidenciado que a função de calibração é linear, por isso avaliou-se a sensibilidade através da média dos declives obtidos ao longo do tempo.

A Figura 5.4 apresenta os declives obtidos ao longo do tempo (os dados utilizados encontram-se no ANEXO I). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Na Figura 5.4 também estão representados os critérios de aceitação do laboratório (limite superior e inferior) do método analítico.

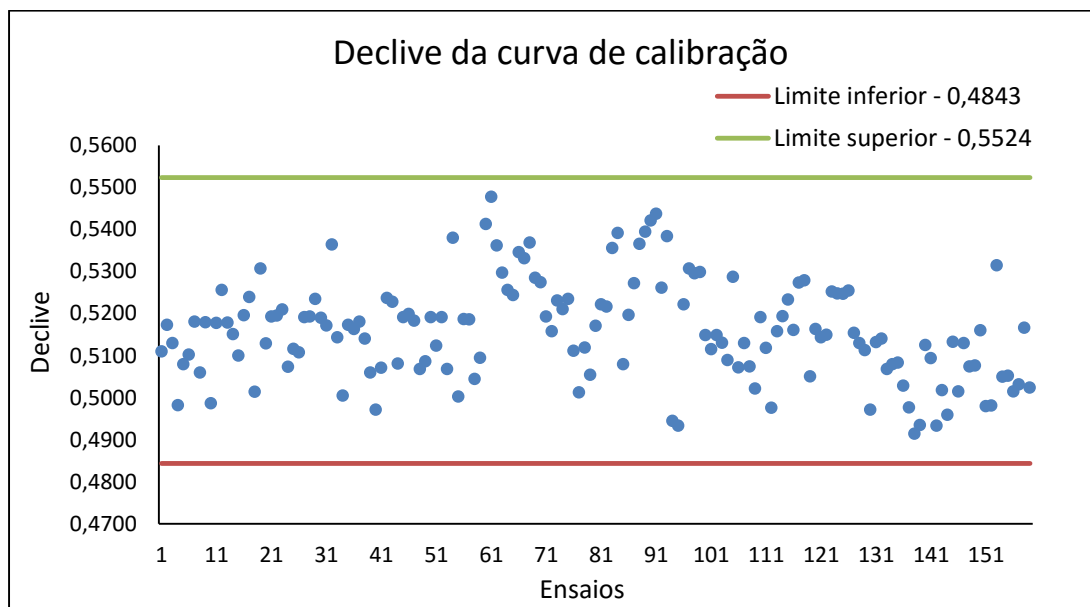


Figura 5.4 – Representação gráfica dos declives obtidos ao longo do tempo.

Através da média dos declives representados na Figura 5.4 (0,5158) e do desvio padrão (0,0117), obteve-se um coeficiente de variação de 2,26%.

Tendo em conta os dados utilizados e o desvio padrão referido anteriormente, o declive do método pode variar entre 0,4808 e 0,5508, com uma confiança estatística de 99,7 % ($\pm 3\sigma$).

5.1.5 Determinação da precisão do método

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos por medições repetidas da mesma amostra, amostras idênticas ou padrões em condições detalhadas. Este parâmetro normalmente é expresso pelo desvio padrão e varia com a gama de concentrações. A precisão pode ser avaliada através da repetibilidade, da reprodutibilidade e da precisão intermédia ou variabilidade interlaboratorial. (RELACRE, 2000a)

5.1.5.1 Determinação da repetibilidade do método

A repetibilidade consiste na determinação da precisão a partir da realização de ensaios sob as mesmas circunstâncias. Ou seja, todos os ensaios são realizados pelo mesmo analista, pelo mesmo laboratório/equipamento, utilizando os mesmos reagentes num reduzido intervalo de tempo. A análise de padrões, de materiais de referência ou a adição de várias concentrações dentro da gama de trabalho são formas de determinar este parâmetro.

Este tipo de análise pode ser aplicado através de um ensaio interlaboratorial ou através da realização de ensaios no próprio laboratório. Se a repetibilidade é avaliada no próprio laboratório, deve-se realizar pelo menos dez ensaios com a mesma amostra (ou padrão). Se necessário, deve-se proceder de forma análoga, mas com diferentes concentrações dentro da gama de trabalho do método.

O limite de repetibilidade (r) é o maior valor admitido para a diferença absoluta entre dois resultados de ensaios ($|X_i - X_{i-1}| < r$) com uma confiança estatística de 95%. Este limite permite averiguar se a diferença entre as análises realizadas é significativa. Desta forma, os resultados da repetibilidade só são considerados satisfatórios quando a diferença absoluta entre as análises não ultrapassar o limite de repetibilidade. Este parâmetro pode ser determinado através da Equação (5.9), onde S_n é o desvio padrão de repetibilidade associado aos resultados.

$$r = t\sqrt{2}S_n = 1,96 \sqrt{2}S_n = 2,8 \sqrt{S_n^2} \quad (5.9)$$

A repetibilidade também é avaliada através análise do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), em cada concentração, a partir da Equação (5.10), onde \bar{x} é a média dos valores considerados. (RELACRE, 2000a; RELACRE, 1996b; Silva, et al., 2006)

$$CV_r = \frac{S_n}{\bar{x}} \times 100 \quad (5.10)$$

Na determinação da repetibilidade pelo método direto e pelo método com destilação, realizaram-se 10 análises dos padrões de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L e 1,0 mgNH₄⁺/L.

A Tabela 5.6 apresenta os valores das análises dos padrões de controlo no método direto e no método com destilação.

Tabela 5.6 – Valores referentes à repetibilidade do método direto e do método com destilação.

Concentração (mg/L)	<i>Método direto</i>		<i>Método com destilação</i>	
	Padrão 0,15 mgNH₄⁺/L	Padrão 1,00 mgNH₄⁺/L	Padrão 0,15 mgNH₄⁺/L	Padrão 1,00 mgNH₄⁺/L
	0,137	0,973	0,156	0,973
	0,141	0,977	0,152	0,971
	0,137	0,984	0,162	0,969
	0,145	0,975	0,166	0,971
	0,141	0,982	0,160	0,969
	0,145	0,979	0,162	0,988
	0,137	0,979	0,160	0,979
	0,143	0,986	0,152	0,990
	0,143	0,973	0,166	0,973
	0,137	0,973	0,164	0,973

A avaliação da repetibilidade foi efetuada através do limite de repetibilidade (Equação (5.9)) e do coeficiente de variação (Equação (5.10)).

Na Tabela 5.7 encontram-se os valores obtidos das médias, dos desvios padrão, dos coeficientes de variação e dos limites de repetibilidade do método direto e do método com destilação.

Tabela 5.7 – Média, desvio padrão, coeficiente de variação e o limite de repetibilidade de cada método.

<i>Método</i>	<i>Padrão (mgNH₄⁺/L)</i>	<i>Média</i>	<i>S_{ri}</i>	<i>CV_r (%)</i>	<i>r</i>
Direto	0,15 mgNH ₄ ⁺ /L	0,141	0,0033	2,33	0,0092
Destilação		0,160	0,0050	3,12	0,0140
Direto	1,00 mgNH ₄ ⁺ /L	0,978	0,0050	0,51	0,0141
Destilação		0,975	0,0078	0,80	0,0218

A diferença absoluta entre os resultados dos ensaios não pode ultrapassar o limite de repetibilidade (r). Desta forma, pela análise da Tabela 5.7, no método direto, a diferença absoluta entre os resultados dos ensaios é considerada satisfatória se não ultrapassar o valor de 0,0092 no padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L e 0,0141 no padrão de 1,00 mgNH₄⁺/L.

No método com destilação, esta diferença é considerada satisfatória se não ultrapassar o valor de 0,0140 no padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L e 0,0218 no padrão de 1,00 mgNH₄⁺/L.

No método direto, verifica-se que o coeficiente de variação da repetibilidade do padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L, apresenta valores mais elevados comparativamente ao padrão de 1,00 mgNH₄⁺/L. Portanto, conclui-se que o primeiro padrão está sujeito a um maior número de erros aleatórios. Relativamente ao método com destilação, verifica-se que o coeficiente de variação da repetibilidade do padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L, apresenta valores mais elevados comparativamente ao padrão de 1,00 mgNH₄⁺/L. Portanto, também é possível concluir que o primeiro padrão em ambos os métodos está sujeito a um maior número de erros aleatórios.

5.1.5.2 Determinação da reprodutibilidade do método

A reprodutibilidade consiste na determinação da precisão a partir da realização de ensaios com a mesma amostra mas em circunstâncias diferentes. Ou seja, a amostra é analisada em diferentes laboratórios, analistas e equipamentos em períodos de tempo diferentes. A análise deste parâmetro é realizada através dos ensaios interlaboratoriais, em que uma mesma amostra é analisada por vários laboratórios.

A avaliação da reprodutibilidade não é muito importante na validação de um método de análise num laboratório de rotina, pois as metodologias são executadas em condições de trabalho que não variam significativamente. No entanto, este parâmetro torna-se importante quando se pretende avaliar se um método é preciso, independentemente das condições em que é executado. No caso em que se pretende apresentar um método novo à comunidade científica é importante avaliar este parâmetro.

A reprodutibilidade é obtida através da Equação (5.11), em que S_{Ri}^2 é a variância da reprodutibilidade, S_{Li}^2 é a variância interlaboratorial e S_{ri}^2 é a variância da repetibilidade.

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (5.11)$$

O limite de reprodutibilidade (R) permite ao operador averiguar se a diferença entre as análises realizadas ($|X_i - X_{i-1}| < R$) é significativa, com um nível de confiança de 95%. Desta forma, os resultados da reprodutibilidade só são considerados satisfatórios quando a diferença absoluta entre as análises não ultrapassar o limite de reprodutibilidade. Este limite é determinado através da Equação (5.12), onde S_{Rj}^2 é a variância da reprodutibilidade associada aos resultados de cada laboratório e S_{Ri} é o desvio padrão de reprodutibilidade associado aos resultados de cada laboratório.

$$R = t\sqrt{2}S_{Ri} = 1,96 \sqrt{2}S_{Ri} = 2,8 \sqrt{S_{Rj}^2} \quad (5.12)$$

A reprodutibilidade também é avaliada através análise do coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R), a partir da Equação (5.13), onde S_{Ri} é o desvio padrão da reprodutibilidade associado aos resultados de cada laboratório e \bar{x} é a média dos valores estimados. (Silva, et al., 2006; RELACRE, 2000a)

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (5.13)$$

Em cada método, a reprodutibilidade foi determinada a partir de ensaios interlaboratoriais diferentes.

A avaliação da reprodutibilidade foi efetuada através da Equação (5.11). No que diz respeito ao coeficiente de variação e ao limite de reprodutibilidade, estes foram determinados através das Equações (5.12) e (5.13), respetivamente.

A Tabela 5.8 apresenta os valores referentes à reprodutibilidade do método direto e do método com destilação.

Tabela 5.8 – Valores referentes à reprodutibilidade de cada método.

Método	S_{Li}^2	S_{Ri}^2	S_{Ri}^2	$Cv_R(\%)$	R
Direto	0,00163	0,000028	0,00163	16,81	0,113
Destilação	0,819	0,039	0,858	6,25	2,594

Na Tabela 5.8, verifica-se que no método direto, uma mesma amostra analisada em condições de trabalho diferentes, tem o coeficiente de variação mais elevado.

Como referido anteriormente, a diferença absoluta entre os resultados dos ensaios não pode ultrapassar o limite de reprodutibilidade (R). Desta forma, pela análise da Tabela 5.8, a diferença absoluta entre os resultados dos ensaios não pode ultrapassar o valor de 0,113 no método direto e 2,594 na destilação.

5.1.5.3 Determinação da precisão intermédia do método

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada a partir de amostras iguais, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, em que é definido exatamente quais as condições que variam (uma ou mais). As condições a variar podem ser o analista, o equipamento ou o intervalo temporal. Este parâmetro é considerado o mais representativo da variabilidade dos resultados num laboratório.

Na metodologia em estudo, a avaliação deste parâmetro consistiu em efetuar n medições sobre os padrões. Estas medições foram realizadas com diferentes analistas, diferentes marcas de reagentes, diferentes intervalos temporais, entre outras condições.

Este parâmetro pode ser obtido através de cartas de controlo de amplitudes que podem ser utilizados em réplicas, duplicados e padrões.

A precisão intermédia também pode ser determinada através da Equação (5.14), sendo n maior ou igual a 15.

$$Si_0 = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (5.14)$$

Onde, Si_0 é o desvio padrão da precisão intermédia (entre parêntesis indica-se os símbolos das condições intermédias da precisão), t é o número de amostras, n é o número de ensaios realizados por amostra, k é o número do resultado obtido para a amostra (de 1 a n), y_k é o resultado individual para a amostra e por último \bar{y} é a média dos resultados da amostra. (Silva, et al., 2006; RELACRE, 2000a)

A Tabela 5.9 apresenta os valores referentes à precisão intermédia no método direto com os padrões de 0,15 mg NH_4^+ /L e 1,00 mg NH_4^+ /L.

Tabela 5.9 - Desvio padrão relativo à precisão intermédia no método direto.

Desvio padrão	Resultado
$S_{0,15}$	0,0085
$S_{1,00}$	0,0170

Através da análise dos resultados da Tabela 5.9 verifica-se que existe uma maior dispersão no último padrão de controlo 1,00 mg NH_4^+ /L.

A Tabela 5.10 apresenta os valores referentes à precisão intermédia no método com destilação com os padrões de 0,15 mg NH_4^+/L , 0,50 mg NH_4^+/L e 1,00 mg NH_4^+/L .

Tabela 5.10 - Desvio padrão relativo à precisão intermédia no método com destilação.

Desvio padrão	Resultado
S_{0,15}	0,0128
S_{0,50}	0,0228
S_{1,00}	0,0415

Através da análise dos resultados da Tabela 5.10 verifica-se que existe uma maior dispersão dos resultados no último padrão de controlo (1,00 mg NH_4^+/L).

Comparando os resultados da Tabela 5.9 e da Tabela 5.10, verifica-se que existe uma maior dispersão nos resultados obtidos no método com destilação.

5.1.6 Determinação da robustez do método

A robustez avalia a sensibilidade de um método perante pequenas variações. Um método é considerado robusto, quando este é praticamente insensível a estas variações durante a sua realização. A robustez pode ser determinada através da variação das condições de operação, nomeadamente condições de precisão intermédia ou através do teste de Youden. A validação desta característica normalmente é realizada na etapa final de um processo de validação.

A avaliação deste parâmetro tem uma grande importância quando se pretende validar métodos inovadores. Apesar de não ter sido planeado estudar a robustez do método, os dados utilizados na validação do método representam a variação das condições de operação ao longo do tempo. (RELACRE, 2000a)

5.1.7 Determinação da incerteza do método

Este parâmetro é abordado de uma forma mais aprofundada no Capítulo 6- Incertezas.

5.1.8 Determinação da exatidão do método

Um método de ensaio é considerado exato quando os resultados obtidos estão em concordância com o valor de referência. Este parâmetro deve ser estimado depois da caracterização da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método em questão. Os Materiais de Referência Certificados (MRC), os ensaios interlaboratoriais e os testes comparativos são as principais formas de avaliar a exatidão através da avaliação direta. (Silva, et al., 2006)

5.2 Processo de validação por avaliação direta

O processo de validação por avaliação direta consiste essencialmente em avaliar a exatidão de um método analítico. Como mencionado anteriormente, este parâmetro de validação pode ser avaliado através de Materiais de Referência Certificados (MRC), de ensaios interlaboratoriais e de testes comparativos

5.2.1 *Materiais de Referência Certificados (MRC)*

Um Material de Referência (MR) consiste num material com propriedades bem estabelecidas que é utilizado para avaliação de um método de análise. Nesta categoria estão incluídos os padrões preparados pelo laboratório e por empresas comerciais (ou entidades externas). Relativamente ao Material de Referência Certificado (MRC), este consiste num material com propriedades certificadas preparado por entidades oficiais, onde é atribuído a cada parâmetro um valor certificado e a sua incerteza. Este material é certificado através da execução de ensaios interlaboratoriais e/ou com diversas técnicas de análise.

Quando se utiliza um MRC, o resultado obtido deve ser comparado com o valor considerado verdadeiro. Caso o desempenho do laboratório não seja satisfatório, este deve averiguar as causas e aplicar as ações corretivas necessárias. A participação neste tipo de análises é estabelecida consoante a quantidade de análises realizadas, as técnicas utilizadas, o conhecimento das amostras e o nível de confiança exigido. (IPAC, 2010b; RELACRE, 1996b; RELACRE, 2000a; IPQ, 2008)

A determinação da exatidão através de MRC não foi efetuada pois não havia disponível no laboratório este tipo de material.

5.2.2 *Ensaaios interlaboratoriais*

Um ensaio interlaboratorial consiste na avaliação de um ensaio com uma mesma amostra/material por vários laboratórios, com condições pré-definidas. Existem vários tipos de ensaios interlaboratoriais consoante a sua finalidade, nomeadamente o ensaio de aptidão, o ensaio de normalização e o ensaio de certificação. Se o objetivo da realização de um ensaio interlaboratorial é comprovar a exatidão dos seus ensaios, então o laboratório deve participar num ensaio de aptidão ou de certificação. Mas se o laboratório pretende comprovar a sua precisão e avaliar as características do método em causa, então deve participar num ensaio de normalização.

O ensaio de aptidão avalia o desempenho dos laboratórios, onde cada laboratório decide o método que pretende realizar. O ensaio de normalização tem como finalidade avaliar as características de um método analítico (repetibilidade e reprodutibilidade), onde se deve apenas usar o método em causa. O ensaio de certificação consiste em obter um valor certificado para um material candidato a material de referência certificado.

Em qualquer ensaio interlaboratorial, o laboratório deve ter um documento onde menciona as condições de execução do ensaio, tais como o tipo de amostra, os parâmetros, os participantes, os métodos de análise, os resultados obtidos, entre outras informações. (RELACRE, 2000a; RELACRE, 1996b; IPAC, 2010b)

Tanto nos ensaios interlaboratoriais de aptidão como na análise de materiais de referência certificados, o seu desempenho pode ser avaliado através de várias metodologias, tais como o Erro Relativo, o Teste de hipóteses (teste t), fator de desempenho Z (“Z-score”) e o erro normalizado.

Teste de hipóteses

O teste de hipóteses também avalia a existência de erros sistemáticos no método utilizado e pode ser obtido através da Equação (5.15).

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v)\sqrt{N}}{S_{xlab}} \quad (5.15)$$

Onde N é o número de amostras ensaiadas e S_{xlab} é o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (X_{lab}). Posteriormente, compara-se o valor t (em módulo) com o valor crítico tabelado para $N-1$ graus de liberdade (t_{tab}). No caso de $|t| \leq t_{tab}$, o ensaio é considerado satisfatório, mas se $|t| > t_{tab}$, o ensaio indica a existência de erros sistemáticos e é considerado insatisfatório. (RELACRE, 2000a; RELACRE, 1996b)

Tanto no método direto como no método com destilação, a exatidão foi determinada a partir de ensaios interlaboratoriais, sendo o seu desempenho avaliado através do Erro relativo, do Fator de Desempenho Z e do Erro Normalizado.

No método direto, utilizou-se um ensaio interlaboratorial da Relacre, em que a matriz utilizada representa águas limpas (naturais e/ou consumo).

Relativamente ao método com destilação, utilizou-se um ensaio interlaboratorial da Aquacheck, em que a matriz utilizada representa as águas residuais.

Erro relativo

O erro relativo avalia a existência dos erros sistemáticos e pode ser determinado através da Equação (5.16), onde X_{lab} é o valor determinado experimentalmente e o X_v é o valor aceite como verdadeiro. (RELACRE, 2000a; RELACRE, 1996b)

$$E_r = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} 100 \quad (5.16)$$

A Tabela 5.11 apresenta os valores referentes ao cálculo do erro relativo.

Tabela 5.11 - Valores referentes à determinação do Erro Relativo de cada método.

<i>Método</i>	<i>X_{lab} (mg/L)</i>	<i>X_v (mg/L)</i>	<i>E_r (%)</i>
Direto	0,27	0,28	-3,57
Destilação	0,47	0,464	1,29

Através da Tabela 5.11, verifica-se que o Erro relativo obtido nos ensaios interlaboratoriais é aceitável.

Fator de desempenho Z “Z-score”

Também é possível avaliar o desempenho através da determinação do fator de desempenho Z (“Z-score”) obtido a partir da Equação (5.17).

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (5.17)$$

Onde *S* é a unidade de desvio associada à incerteza do MRC ou ao desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial.

Segundo o protocolo AOAC & ISSO & IUPAC, a avaliação pode ser realizada através da escala de pontuação da Figura 5.5. (RELACRE, 2000a; RELACRE, 1996b)

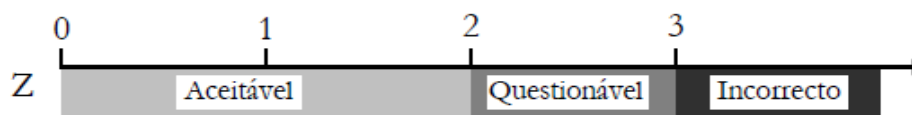


Figura 5.5 - Escala de pontuação utilizada na avaliação do factor de desempenho Z (“Z-score”) (adaptado de (RELACRE, 1996b))

A Tabela 5.12 apresenta os valores referentes à determinação do Z-score.

Tabela 5.12 - Valores referentes à determinação do Z-score de cada método.

<i>Método</i>	<i>X_{lab} (mg/L)</i>	<i>X_v (mg/L)</i>	<i>Z-score</i>
Direto	0,27	0,28	-0,5
Destilação	0,47	0,464	0,13

Analisando a Tabela 5.12, constata-se que em ambos os ensaios interlaboratoriais obteve-se um desempenho satisfatório.

Erro normalizado

No caso em que exista o cálculo da incerteza dos resultados (U_{lab}), o valor considerado verdadeiro (X_V) pode estar no intervalo de incerteza de X_{lab} e o desempenho do laboratório pode ser determinado através da Equação (5.18).

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_V)}{\sqrt{U_{Lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (5.18)$$

Onde U_{ref} é a incerteza associada ao valor verdadeiro. Quando $|E_n| \leq 1$, o desempenho do laboratório é satisfatório. (RELACRE, 2000a; RELACRE, 1996b)

No método direto, obteve-se um erro normalizado de -0,2 com U_{ref} de 0,04 mg/L, sendo estes valores fornecidos pelo ensaio interlaboratorial. No entanto, o Erro normalizado no método com destilação foi determinado manualmente através da Equação (5.18). A Tabela 5.13 apresenta os valores referentes o cálculo deste erro normalizado.

Tabela 5.13 – Valores da incerteza associada ao valor verdadeiro, da incerteza associada aos resultados do laboratório e o respetivo erro normalizado na destilação.

Método	U_{lab} (mg/L)	U_{ref} (mg/L)	E_n
Destilação	0,07	0,003	0,081

Os valores obtidos dos erros normalizados indicam que as incertezas estipuladas pelo laboratório foram bem estimadas, por isso conclui-se que o desempenho do laboratório é satisfatório em ambos os métodos.

5.2.3 Testes Comparativos

Os testes comparativos tem como principal finalidade avaliar a exatidão dos resultados de um método de ensaio interno por comparação com os resultados obtidos com método de referência. Ou seja, realizam-se os dois métodos de ensaio em separado utilizando as mesmas amostras. (RELACRE, 2000a)

6 INCERTEZAS

A estimativa da incerteza é muito importante, principalmente em laboratórios de análises de rotina como a AEMITEQ, uma vez que confere às análises realizadas a credibilidade e a qualidade exigidas pelo cliente e pelo próprio laboratório. Na perspectiva do cliente, as incertezas atribuídas aos ensaios requisitados permitem verificar o cumprimento de limites legais ou regulamentares. Na perspectiva do próprio laboratório, as incertezas permitem avaliar a qualidade dos resultados das metodologias aplicadas, e se for necessário promover a sua melhoria. Desta forma, torna-se possível tomar decisões corretas com base nos resultados apresentados. (Eurachem/Citac, 2012)

A incerteza é representada por uma faixa de valores que indica a possível dispersão de resultados de uma medição. Facilmente, este conceito pode ser confundido com o erro. Este parâmetro consiste na diferença entre o valor medido e o valor considerado verdadeiro, enquanto que a incerteza expressa uma gama de valores, aos quais o valor medido pode dispersar. A diferença entre erro e a incerteza encontra-se representada na Figura 6.1.



Figura 6.1 - Diferença entre o erro e incerteza. (adaptado de (RELACRE, 1996b))

As principais fontes de incertezas provêm de erros aleatórios e sistemáticos. O erro aleatório advém de alterações imprevisíveis, enquanto que o erro sistemático é proveniente de alterações previsíveis e constantes. Se aumentar o número de medições minimiza o erro aleatório, mas não o erro sistemático.

Numa metodologia existem vários fatores (fontes de incerteza) que contribuem para a incerteza do método. Estas fontes de incerteza podem ser provenientes da amostragem, da matriz, das interferências, das condições ambientais, das massas, dos equipamentos, da preparação da amostra e dos padrões da calibração, entre outros igualmente importantes.

A estimativa da incerteza pode ser realizada através da quantificação de cada fonte individualmente ou através dos dados provenientes do desempenho do método. No entanto, é necessário ter em consideração que nem todas as fontes de incerteza identificadas têm a mesma contribuição na incerteza final. Na escolha da abordagem mais apropriada para cada situação é necessário ter em conta a sua finalidade e os resultados disponíveis.

As abordagens mais utilizadas são:

- Abordagem passo-a-passo ou “bottom-up”;
- Abordagem supra-analítica - Abordagem baseada em dados de validação e controlo de qualidade interno;
- Abordagem supralaboratorial - Esta abordagem é uma combinação dos resultados provenientes dos ensaios interlaboratoriais, mas também dos dados de controlo de qualidade. (Eurachem/Citac, 2012; ISO, 2012; Eurolab, 2002a)

As abordagens anteriormente mencionadas encontram-se descritas de uma forma mais pormenorizada na seção seguinte.

6.1 Abordagem passo-a-passo

A abordagem passo-a-passo fundamenta-se na identificação e quantificação de todas as fontes de incertezas, que posteriormente são combinadas entre si, através da lei de propagação de incertezas. Em algumas situações, esta abordagem pode ser mais realista do que as restantes abordagens, nomeadamente quando esta é fundamentada numa longa experiência e reflete o desempenho experimental do método. Por isso, esta abordagem é tão válida quanto as outras abordagens referidas nesta seção. A determinação da incerteza associada a um método através deste tipo de abordagem é efetuada realizando os seguintes passos:

- Passo 1 - Especificar o mensurando e identificar as fontes de incerteza;
- Passo 2 - Determinar as variáveis de entrada;
- Passo 3 - Determinar a incerteza padrão;

A determinação de incertezas padrão pode ser efetuada através da avaliação do tipo A ou do tipo B. A avaliação do tipo A é realizada mediante uma análise estatística de várias observações experimentais. Enquanto que a avaliação do tipo B é efetuada mediante outras fontes diferentes da avaliação do tipo A, nomeadamente certificados de calibração, especificações do fabricante ou valores obtidos na literatura. Supostamente, a avaliação do tipo A é mais objetiva, o que pode constituir uma vantagem em relação à B. No entanto, a quantificação do desvio padrão com um número reduzido de medições pode resultar em estimativas imprecisas.

- Passo 4 - Identificar e quantificar correlações entre variáveis. Quando as variáveis tem uma fonte de incerteza em comum é possível correlaciona-las entre si, tendo sempre o cuidado para não subestimar ou sobrestimar a incerteza.
- Passo 5 – Determinar a incerteza combinada;
- Passo 6 – Determinar a incerteza expandida. (IPAC, 2007c; Eurachem/Citac, 2012; Eurolab, 2002a; Eurolab, 2006b; Burin, 2006)

6.2 Abordagem supra-analítica

A estimativa da incerteza pela abordagem supra-analítica baseia-se em dados de validação e controlo de qualidade interno, em condições de precisão intermédia. Esta abordagem é constituída por dois importantes componentes, designadamente a estimativa da incerteza associada à precisão e à exatidão. Ambas são consideradas componentes independentes, onde a determinação da mensuranda envolve somente uma multiplicação ou uma adição, consoante a gama de concentrações em estudo. Este tipo de abordagem pode ser incluído na abordagem “passo-a-passo”, onde a incerteza padrão pode estar associada à exatidão e à precisão

No que diz respeito à estimativa da incerteza associada à precisão, esta pode ser efetuada a partir da determinação do desvio padrão através dos limites de controlo de uma carta de controlo de valores individuais, do desvio padrão dos resultados duplicados de uma amostra (ou um padrão de controlo) ou da amplitude média dos duplicados de várias amostras. O desvio padrão aumenta significativamente com a concentração do analito, por isso é necessário ajustar a estimativa da incerteza à situação em estudo. Consoante a gama de concentrações em estudo, a estimativa é efetuada com a incerteza associada à precisão sob a forma de incerteza padrão absoluta ou relativa.

A estimativa da incerteza associada à exatidão pode ser quantificada através de materiais de referência certificados, amostras fortificadas ou amostras analisadas por um método de referência. Após a estimativa desta incerteza, é essencial avaliar os resultados de forma a averiguar se estes são afetados por desvios sistemáticos. O teste t-Student e a análise de tendências são ferramentas que podem ser utilizadas nesta avaliação. (IPAC, 2007c; Eurachem/Citac, 2012; Eurolab, 2006b)

6.3 Abordagem supralaboratorial

A abordagem supralaboratorial baseia-se em ensaios interlaboratoriais para estimar a incerteza, mas também utiliza dados da validação e do controlo de qualidade interno. Este tipo de abordagem utiliza esses parâmetros para avaliar a estimativa da incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório e ao bias do método e do laboratório.

No estágio em questão, a estimativa da incerteza foi efetuada através desta abordagem, nomeadamente pela ISO 11352:2012. Desta forma, a secção seguinte constitui uma versão integral da ISO 11352:2012.

6.3.1 Estimativa da incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório

A estimativa desta incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório (representada por u_{R_w}) pode ser obtida através do desvio-padrão dos resultados de uma amostra ou das suas réplicas em condições de precisão intermédia. No entanto, é preciso ter em conta que o desvio-padrão aumenta significativamente com a concentração do componente em análise. Por isso, é necessário ajustar a incerteza estimada às condições do método.

É recomendável utilizar no mínimo 8 medições para estimar a incerteza com confiança. No entanto, quanto maior o número de medições, maior é a confiança atribuída à incerteza estimada.

Esta incerteza pode ser estimada de várias formas, consoante o tipo de amostra de controlo do método.

- No caso de **as amostras de controlo serem estáveis e abrangerem todo o processo de análise**, o componente de incerteza pode ser determinado através do desvio padrão dos resultados obtidos no controlo de qualidade. Os valores obtidos nas cartas de controlo de qualidade são utilizados na determinação do desvio-padrão, que neste caso, é igual ao componente de incerteza ($s_{R_w} = u_{R_w}$).

- Quando se utilizam **amostras de controlo instáveis**, a estimativa da incerteza é quantificada tendo em conta os duplicados de amostras a partir de cartas de controlo e as variações entre lotes.

- E, por último, quando as amostras de controlo de qualidade com matriz idêntica das amostras de rotina não estão disponíveis, pode-se utilizar **amostras sintéticas como amostras de controlo de qualidade**.

Esta estimativa de incerteza (u_{R_w}), aplicou-se tanto no método direto como no método com destilação. Os dados utilizados na estimativa da incerteza no método direto e no método com destilação encontram-se no ANEXO I e no ANEXO III, respetivamente

Nesta situação, as soluções sintéticas podem ser diferentes das amostras em termos de matriz, por isso é necessário ter em conta a falta de homogeneidade das amostras. Desta forma, estima-se esta incerteza através de cartas de controlo de amplitudes com duplicados de amostras de diferentes matrizes.

A amplitude relativa ($R_{j,rel}$) é determinada através da Equação (6.1), onde $x_{i,max} - x_{i,min}$ é a diferença entre duplicados e \bar{x}_j é a média dos duplicados.

$$R_{j,rel} = \frac{x_{i,max} - x_{i,min}}{\bar{x}_j} \quad (6.1)$$

A Figura 6.2 apresenta graficamente as amplitudes relativas (desvio relativo) dos duplicados referentes ao método direto. Os valores dos duplicados utilizados nesta análise encontram-se no ANEXO I. Os valores apresentados representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Além disso, a Figura 6.2 também apresenta o critério de aceitação dos duplicados na metodologia em estudo.

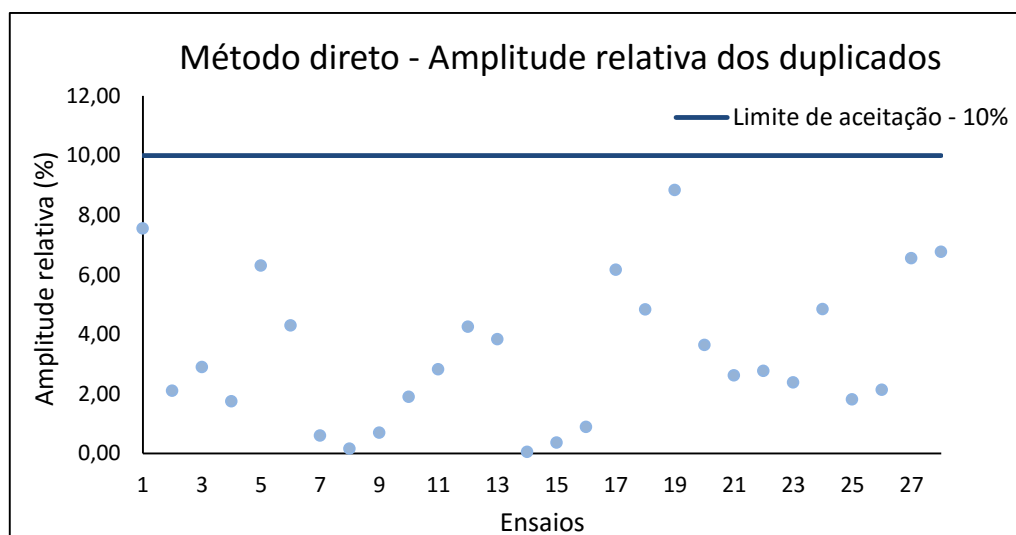


Figura 6.2 – Representação gráfica da amplitude relativa dos duplicados no método direto ao longo do tempo.

Relativamente à Figura 6.3, esta apresenta as amplitudes relativas (desvio relativo) dos duplicados referentes ao método com destilação. Os valores dos duplicados utilizados nesta análise encontram-se no ANEXO III. Os valores apresentados representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Além disso, a Figura 6.3 também apresenta o critério de aceitação dos duplicados na metodologia em estudo.

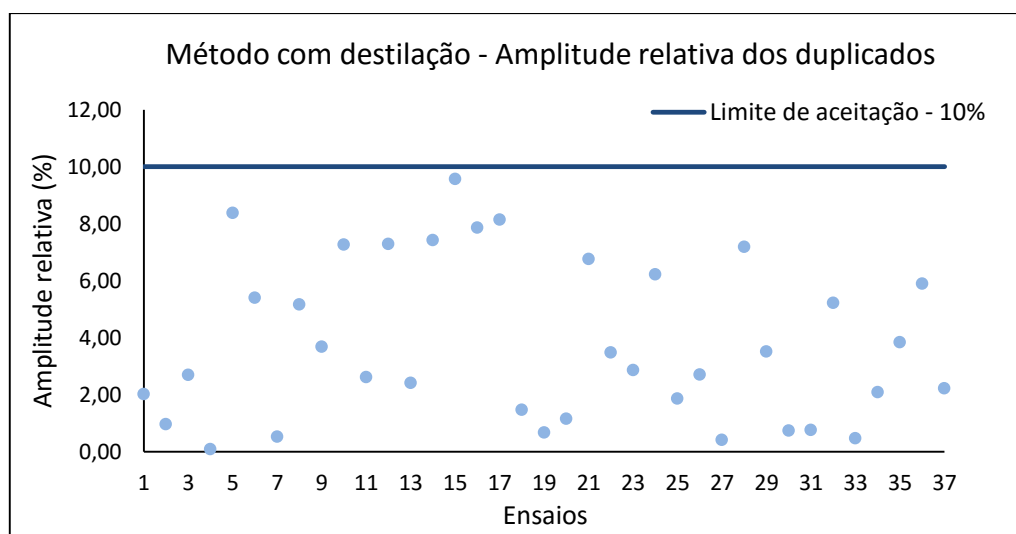


Figura 6.3 – Representação gráfica da amplitude relativa dos duplicados no método com destilação ao longo do tempo.

Após a determinação da amplitude relativa de cada duplicado, determina-se a amplitude relativa média (\bar{R}_{rel}).

Após a determinação da amplitude relativa média dos duplicados (\bar{R}_{rel}), determina-se o componente da incerteza da carta de controlo de amplitudes ($u_{r,range}$) através da Equação (6.2), onde d_2 é o fator utilizado para o cálculo do desvio-padrão da amplitude média. Uma vez que este fator varia consoante o número de valores utilizados no cálculo da amplitude, e que apenas se utilizaram dois valores neste cálculo, o valor considerado foi de 1,128.

$$u_{r,range,rel} = C_v = \frac{\bar{R}_{rel}}{d_2} \quad (6.2)$$

A Tabela 6.1 apresenta os valores referentes ao cálculo do componente da incerteza da carta de controlo de amplitudes.

Tabela 6.1- Valores da amplitude relativa média e o componente da incerteza da carta de controlo de amplitudes no método direto e no método com destilação.

Método	\bar{R}_{rel}	$u_{r,range,rel}$
Direto	3,36	2,98
Destilação	3,81	3,38

Pela análise da Tabela 6.1, verificou-se que os valores dos duplicados contribuem para a estimativa da incerteza em 2,98% no método direto e 3,38% no método com destilação.

Além do componente da incerteza anteriormente mencionado, também é necessário estimar o componente de incerteza referente aos padrões de controlo ($u_{RW,stand,rel}$), permitindo assim quantificar a incerteza de uma forma mais realista e com um grau de confiança aceitável. Este componente é determinado através do coeficiente de variação de vários padrões de controlo em condições de precisão intermédia ($C_v = u_{RW,stand,rel}$).

A Figura 6.4 representa graficamente o padrão de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L no método direto (os dados utilizados encontram-se no ANEXO I). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Na Figura 6.4 também apresenta o limite superior e inferior admitido pelo laboratório, tendo em conta que o critério de aceitação é de 10% e a respetiva média.

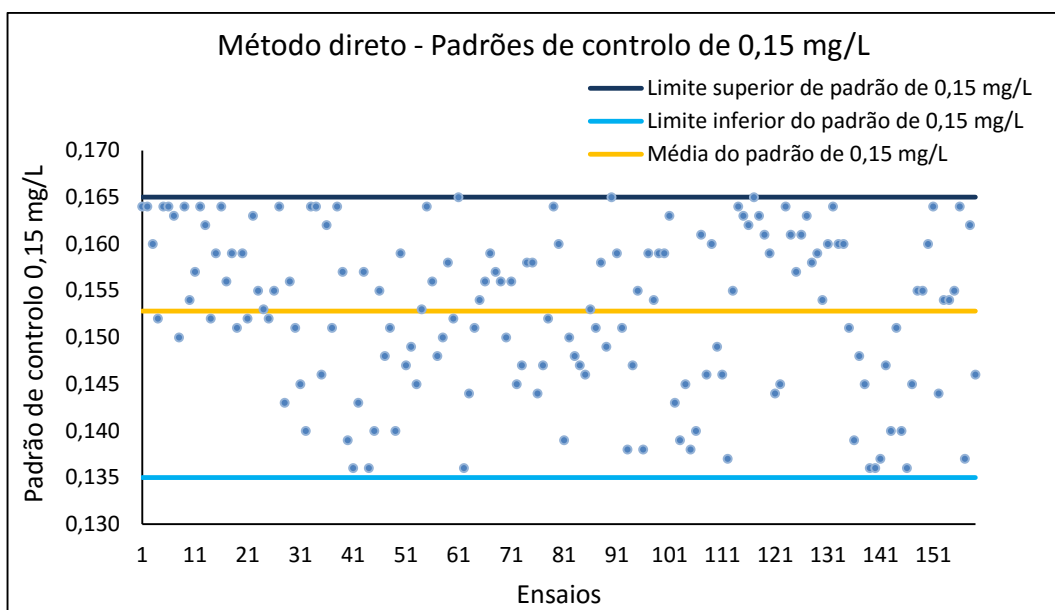


Figura 6.4 – Representação gráfica dos padrões de controle 0,15 mgNH₄⁺/L no método direto ao longo do tempo.

A Figura 6.5 representa graficamente o padrão de controle 1,00 mgNH₄⁺/L no método direto (os dados utilizados encontram-se no ANEXO I). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Na Figura 6.5 também apresenta o limite superior e inferior admitido pelo laboratório, tendo em conta que o critério de aceitação é de 5% e a respetiva média.

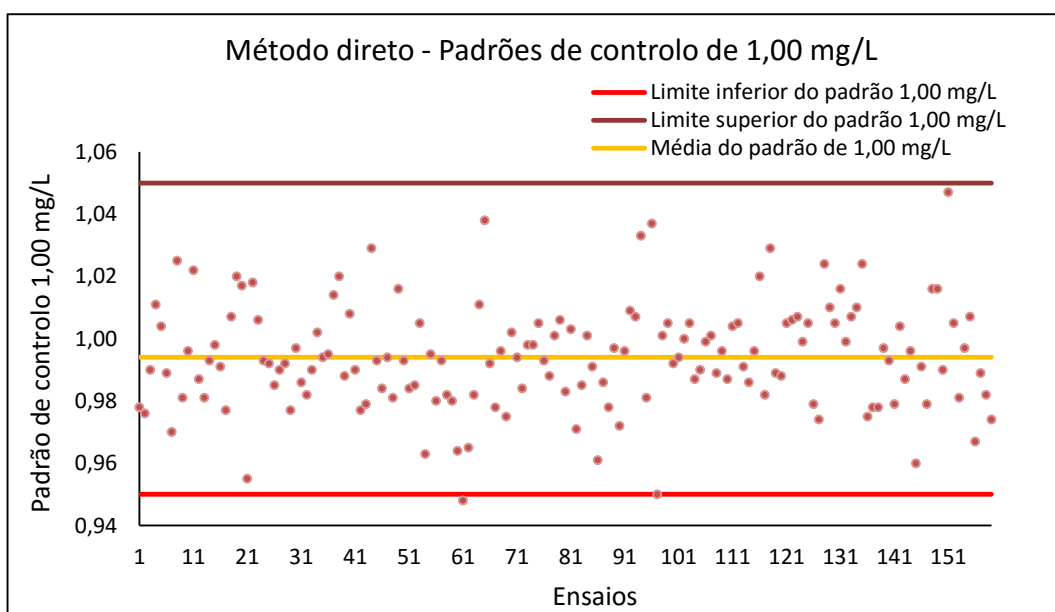


Figura 6.5 – Representação gráfica do padrão de controle 1,00 mgNH₄⁺/L no método direto ao longo do tempo.

Tendo em conta os padrões representados na Figura 6.4 e Figura 6.5 (método direto), determinaram-se os coeficientes de variação nos padrões de controlo de 0,15 mgNH₄⁺/L e de 1,00 mgNH₄⁺/L. Estes padrões representam os padrões de controlo normalmente realizados nas sessões de trabalho.

No método direto, o coeficiente de variação do padrão de controlo de 0,15 mgNH₄⁺/L foi de 5,58 % e no padrão de controlo de 1,00 mgNH₄⁺/L foi de 1,71 %.

Quando é avaliada a precisão em dois ou mais níveis de concentração, a incerteza associada à precisão pode ser determinada através da determinação do coeficiente de variação combinado (CV_{pool}). O CV_{pool} permite associar os coeficientes de variação obtidos em cada nível de concentração, no entanto esta avaliação só é permitida se a diferença entre a máxima e a mínima variância dos padrões não for significativa. Esta avaliação é efetuada através do Teste F. (Barwick, et al., 2000)

Desta forma, foi avaliada possibilidade de determinar o Coeficiente de variação combinado, no entanto verificou-se que existia uma diferença significativa entre a mínima e a máxima variância através do Teste F, o que impossibilita a sua utilização.

Quando se verifica que a diferença entre as variâncias é significativa, a incerteza pode ser dividida por gamas de concentração ou pode ser considerado o pior coeficiente de variação. A incerteza por gamas poderá induzir o cliente em erro, uma vez que no orçamento é fornecido ao cliente a melhor incerteza, isto é, a incerteza mais baixa, sem qualquer informação sobre a matriz da amostra do cliente. Por isso, o laboratório optou por considerar o pior coeficiente de variação.

Desta forma, considerou-se o padrão com o coeficiente de variação mais alto, nomeadamente 5,58 % (Padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L).

A Figura 6.6 representa graficamente o padrão de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L no método com destilação (os dados utilizados encontram-se no ANEXO III). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas durante o estágio e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Na Figura 6.6 também apresenta o limite superior e inferior admitido pelo laboratório, tendo em conta que o critério de aceitação é de 15% e a respetiva média.

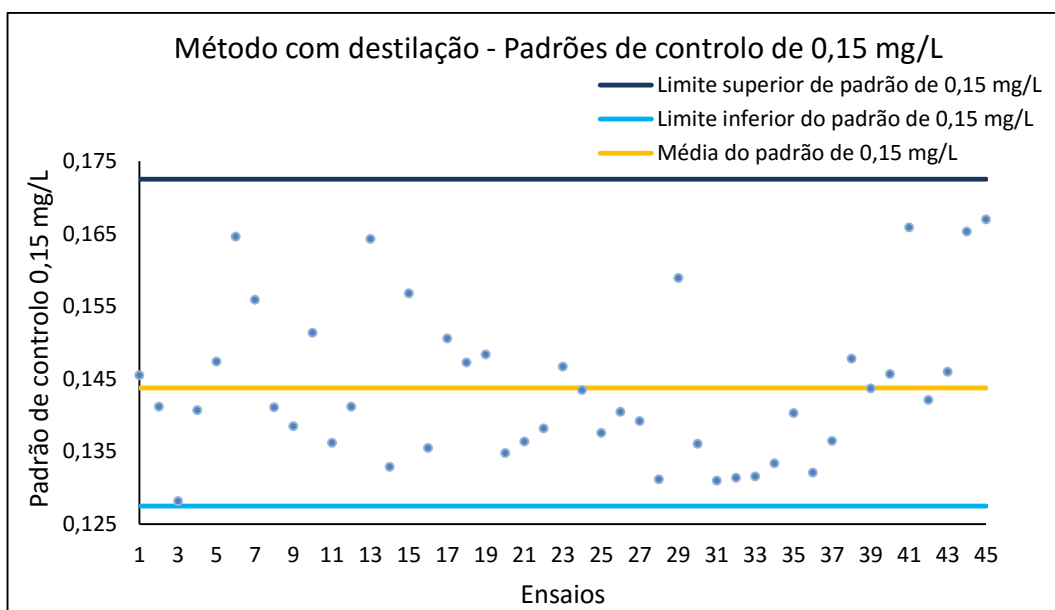


Figura 6.6 - Representação gráfica dos padrões de controle 0,15 mgNH₄⁺/L no método com destilação ao longo do tempo.

A Figura 6.7 representa graficamente o padrão de controle 1,00 mgNH₄⁺/L no método com destilação (os dados utilizados encontram-se no ANEXO III). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas durante o estágio e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Na Figura 6.7 também apresenta o limite superior e inferior admitido pelo laboratório, tendo em conta que o critério de aceitação é de 10% e a respetiva média.

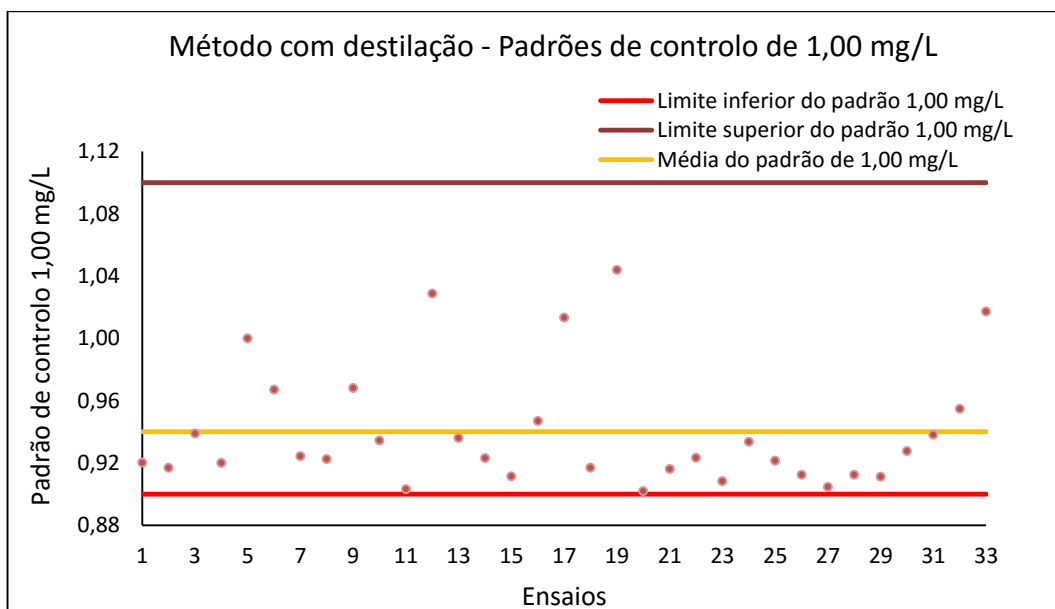


Figura 6.7 - Representação gráfica dos padrões de controle 1,00 mgNH₄⁺/L no método com destilação ao longo do tempo.

A Figura 6.8 representa graficamente o padrão de controlo 0,50 mgNH₄⁺/L no método com destilação (os dados utilizados encontram-se no ANEXO III). Os valores apresentados representam análises que foram realizadas durante o estágio e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Na Figura 6.8 também apresenta o limite superior e inferior admitido pelo laboratório, tendo em conta que o critério de aceitação é de 10% e a respetiva média.

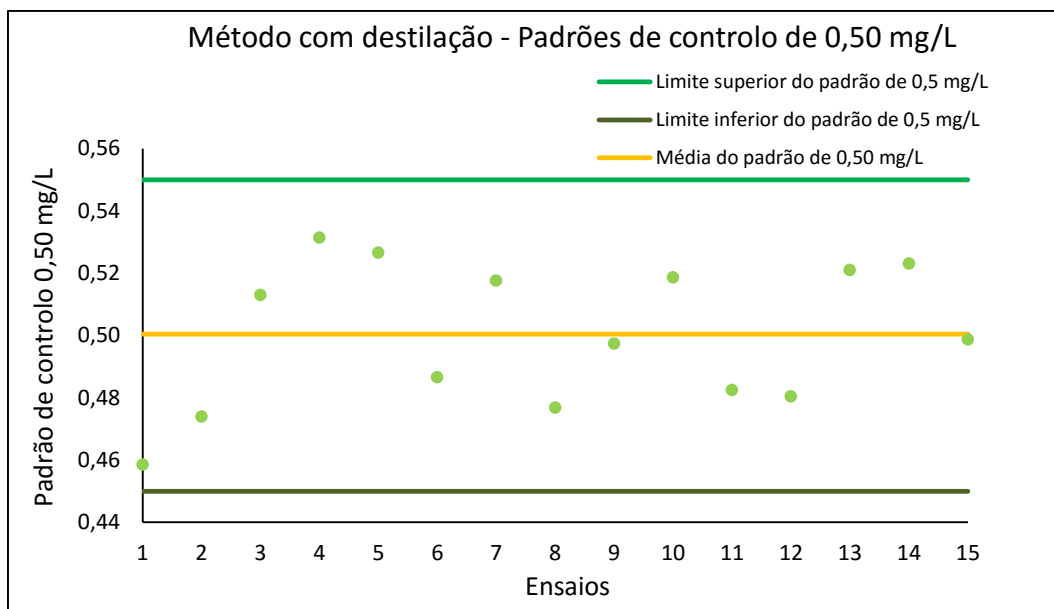


Figura 6.8 - Representação gráfica dos padrões de controlo 0,50 mgNH₄⁺/L no método com destilação ao longo do tempo.

No método com destilação, determinaram-se os coeficientes de variação nos padrões de controlo de 0,15 mgNH₄⁺/L, 0,50 mgNH₄⁺/L e de 1,00 mgNH₄⁺/L. Estes padrões representam os padrões de controlo normalmente realizados nas sessões de trabalho.

Tendo em conta os padrões representados na Figura 6.6, Figura 6.7 e Figura 6.8 no método com destilação, o coeficiente de variação do padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L foi de 7,32 %, no padrão de 0,50 mgNH₄⁺/L foi de 4,57 % e no padrão de 1,00 mgNH₄⁺/L foi de 4,11 %.

Neste método, também foi avaliada a possibilidade de determinar o CV_{pool} , no entanto também se verificou uma diferença significativa entre a mínima e a máxima variância dos padrões. Por isso, considerou-se o padrão com o coeficiente de variação mais alto, designadamente o padrão de 0,15 mgNH₄⁺/L com um coeficiente de variação de 7,32%.

Após a determinação de cada componente, a estimativa da incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório (u_{RW}) pode ser determinada através da Equação (6.3).

$$u_{RW,rel} = \sqrt{u_{RW,stand,rel}^2 + u_{r,range,rel}^2} \quad (6.3)$$

No método direto, obteve-se uma incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório de 6,32 %. Enquanto que no método com destilação, a incerteza obtida foi 8,06 %.

6.3.2 Estimativa da incerteza associada ao bias do método e do laboratório

A incerteza associada ao bias do método e do laboratório representada por u_b , pode ser estimada através de materiais de referência certificados, de ensaios interlaboratoriais ou ensaios de recuperação.

Para estimar esta incerteza é necessário utilizar no mínimo seis lotes, embora em alguns casos esta quantidade não seja suficiente. Por isso, quanto maior o número de lotes utilizados, maior confiança é atribuída à estimativa de incerteza.

- A quantificação da incerteza utilizando **MRC** pode ser efetuada através do certificado do fornecedor, e neste caso, é necessário converter a incerteza fornecida numa incerteza padrão.

- Outra forma de estimar a incerteza associada à exatidão, consiste na utilização de **ensaios interlaboratoriais** através do desvio-padrão da reprodutibilidade. Os ensaios interlaboratoriais contribuem tanto para a reprodutibilidade intra-laboratório como para o bias do método e do laboratório, por isso é necessário ter especial atenção para não sobrestimar a incerteza.

Na estimativa desta incerteza é necessário ter em conta o componente da incerteza média dos valores de referência dos ensaios interlaboratoriais (\bar{u}_{Cref}) e o *RMS* (*root mean square*) da diferença entre o valor verdadeiro e o resultado enviado pelo laboratório (D_{rms}).

Através da Equação (6.4) pode ser determinado o *root mean square* da diferença entre o valor verdadeiro e o resultado enviado pelo laboratório (D_{rms}), em que n_{ilc} é o número de ensaios interlaboratoriais.

$$D_{rms,rel} = \sqrt{\frac{\sum D_{i,rel}^2}{n_{ilc}}} \quad (6.4)$$

Em relação a $D_{i,rel}$, esta pode ser determinada através da Equação (6.5), onde D_i é a diferença entre o valor do laboratório (C_m) e o valor verdadeiro (C_{ass}).

$$D_{i,rel} = \frac{D_i}{C_{ass}} \quad (6.5)$$

Em relação ao componente da incerteza média dos valores de referência dos ensaios interlaboratoriais ($\bar{u}_{C_{ref}}$), esta pode ser determinada através da Equação (6.6).

$$\bar{u}_{C_{ref},rel} = \frac{\sum u_{C_{ref},i}}{n_{ilc}} \quad (6.6)$$

Onde $u_{C_{ref},i}$ é a incerteza associada ao valor verdadeiro do ensaio interlaboratorial. Se o valor verdadeiro é determinado através da média aritmética, esta incerteza é determinada através da Equação (6.7), onde s_R é o desvio padrão da reprodutibilidade e $n_{p,i}$ é o número de participantes do ensaio interlaboratorial.

$$u_{C_{ref},i} = \frac{s_{R,rel}}{\sqrt{n_{p,i}}} \quad (6.7)$$

Mas, se o valor verdadeiro é determinado a partir da mediana ou da média robusta, a incerteza é determinada através da Equação (6.8).

$$u_{C_{ref},i} = 1,25 \times \frac{s_{R,rel}}{\sqrt{n_{p,i}}} \quad (6.8)$$

No método com destilação, a estimativa da incerteza foi determinada através de ensaios interlaboratoriais com um desempenho satisfatório.

Nos ensaios considerados, o valor considerado verdadeiro foi determinado a partir da média robusta, por isso a incerteza relativa do valor verdadeiro ($u_{C_{ref},i}$) foi determinada através da Equação (6.8).

A Tabela 6.2 apresenta os valores referentes à determinação dos componentes da incerteza associada ao bias do método e do laboratório, onde C_{ass} é o valor considerado verdadeiro e C_m é o valor médio reportado pelo laboratório.

Tabela 6.2 - Valores referentes à determinação dos componentes da incerteza associada ao bias do método e do laboratório, no método com destilação.

<i>EIL</i>	C_{ass} (mg/L)	C_m (mg/L)	D_i (%)	$S_{r,i}$ (%)	$n_{p,i}$	$u_{C_{ref},i}$ (%)	$(D_{i,rel})^2$
Relacre	0,84	0,78	-7,14	10,71	49	1,913	51,02
Relacre	0,19	0,18	-5,26	15,79	66	2,429	27,70
Relacre	0,31	0,335	8,06	12,90	69	1,942	65,04
Aquacheck	14,76	13,60	-7,86	6,13	46	1,130	61,77
Aquacheck	5,26	4,90	-6,84	4,75	31	1,067	46,84
Aquacheck	0,464	0,47	1,29	6,08	11	2,291	1,67

Tendo em conta os valores da Tabela 6.2, o *root mean square* da diferença entre o valor verdadeiro e o resultado enviado pelo laboratório (D_{rms}) obtido foi de 6,51%.

Relativamente ao componente da incerteza média dos valores de referência dos ensaios interlaboratoriais ($\bar{u}_{C_{ref}}$), o valor obtido foi de 1,80%.

Após a determinação de cada componente, a estimativa da incerteza associada ao bias do método e do laboratório (u_b) pode ser determinada através da Equação (6.9).

$$u_{b,rel} = \sqrt{D_{rms,rel}^2 + u_{C_{ref},rel}^2} \quad (6.9)$$

Tendo em conta os valores anteriormente mencionados, a incerteza do bias do método e do laboratório no método com destilação foi de 6,75%. Comparando os dois componentes, constatou-se que a incerteza proveniente da diferença entre o valor verdadeiro e o resultado do laboratório contribuiu de uma forma significativa na estimativa da incerteza padrão do bias do método e do laboratório.

- Relativamente aos **ensaios de recuperação**, isto é, ensaios em que é adicionado uma quantidade conhecida de um analito a uma amostra anteriormente analisada, também podem ser utilizados na estimativa de incerteza do bias do método e do laboratório.

No método direto, a estimativa da incerteza associada à exatidão foi determinada através dos ensaios de recuperação.

A estimativa desta incerteza padrão é efetuada com base no *RMS* dos desvios das recuperações (b_{rms}) e na incerteza associada à concentração do analito adicionado (u_{add}).

O **root mean square dos desvios das recuperações** pode ser determinado através da Equação (6.10).

$$b_{rms,rel} = \sqrt{\frac{\sum b_{i,rel}^2}{n_\eta}} \quad (6.10)$$

Onde n_η é o número de ensaios de recuperação e b_i é os desvios das recuperações em relação à recuperação completa ou à média das recuperações. Se o laboratório corrige as fortificações, isto é, retira à amostra a concentração necessária para a recuperação ser completa, os desvios das recuperações são determinados através da Equação (6.11), onde $\bar{\eta}$ é a média das recuperações e η_i é a recuperação de um ensaio.

$$b_{i,rel} = \frac{\eta_i - \bar{\eta}}{\bar{\eta}} \quad (6.11)$$

Quando o laboratório não corrige as fortificações, os desvios das recuperações são determinados através da Equação (6.12).

$$b_{i,rel} = \frac{\eta_i - 100}{100} \quad (6.12)$$

No laboratório Químico da AEMITEQ, os ensaios de recuperação não são corrigidos, desta forma os desvios das recuperações foram determinados através da Equação (6.12).

Assim, a incerteza referente ao *root mean square* dos desvios das recuperações obtida foi de 7,99%

Relativamente à **incerteza da concentração do analito adicionado** (u_{add}), esta é determinada como base em dois componentes, nomeadamente o componente da incerteza referente à concentração da solução da adicionada (u_{conc}) e o componente da incerteza referente ao volume adicionado (u_v).

Na estimativa do componente da **incerteza referente à concentração da solução adicionada** (u_{conc}), é necessário ter em consideração tanto os erros aleatórios como os erros sistemáticos provenientes do material volumétrico. Na determinação desta incerteza considerou-se um balão de 50 mL, 200 mL e com uma pipeta de 2 mL, uma vez que representa o material volumétrico utilizado na preparação da fortificação.

A incerteza da concentração da solução adicionada associada aos **erros sistemáticos** ($u_{v,b}$) pode ser determinada através das informações fornecidas pelo fabricante do material volumétrico, nomeadamente o desvio máximo ou a tolerância.

Quando não há informação suficiente considera-se uma distribuição retangular. Esta distribuição aplica-se quando a probabilidade de os valores medidos se encontrar ao longo do intervalo é sempre 100%, como por exemplo o último dígito de um mostrador digital. Este tipo de distribuição determina-se através da Equação (6.13).

$$u_{v,b,rel} = \frac{\varepsilon_{v,max}}{\sqrt{3}} \quad (6.13)$$

A Tabela 6.3 apresenta os dados fornecidos pelo fabricante (*Normax*) e a respetiva incerteza da concentração da solução adicionada associada aos erros sistemáticos.

Tabela 6.3 - Valores fornecido pelo fabricante e a respetiva incerteza associada aos erros sistemáticos.

Material volumétrico	Quantidade	Volume (mL)	CV (%)	Tolerância (mL)	Tolerância (%)	$u_{v,b,rel}$
Balões	1	200,00	0,013	0,15	0,075	0,043
	1	50,00	0,020	0,06	0,12	0,069
Pipetas	1	2,00	0,050	0,01	0,50	0,289

A estimativa da incerteza da concentração da solução adicionada associada aos **erros aleatórios** ($u_{V,rep}$), baseia-se em ensaios experimentais de repetibilidade com material volumétrico utilizado na preparação da fortificação, nomeadamente um balão de 50 mL, 200 mL e com uma pipeta de 2 mL.

O ensaio experimental de repetibilidade no balão, consistiu em tarar o balão seco numa balança, enchê-lo de água até ao menisco e pesá-lo (sem molhar a parede do balão acima do menisco). Após este procedimento, retirava-se com cuidado alguma água abaixo do traço de referência, enchia-se com água e pesava-se novamente. O ensaio de repetibilidade da pipeta consistiu em tarar um copo de plástico numa balança, adicionar o volume escoado da pipeta de 2 mL e pesar novamente o copo. Estes procedimentos foram realizados 10 vezes em cada material volumétrico a uma temperatura constante.

Na Tabela 6.4 encontram-se os valores obtidos nos ensaios experimentais de repetibilidade em cada material volumétrico.

Tabela 6.4 – Valores obtidos nos ensaios de repetibilidade em cada material volumétrico.

Número de Pesagens	Massa (g)		
	Balão de 200 mL	Balão de 50 mL	Pipeta de 2 mL
1	199,21	49,7528	1,9964
2	199,20	49,7764	1,9941
3	199,14	49,7648	1,9965
4	199,15	49,7593	2,0013
5	199,20	49,7455	1,9952
6	199,15	49,7568	2,0021
7	199,13	49,7650	2,0013
8	199,16	49,7540	2,0036
9	199,14	49,7658	2,0027
10	199,18	49,7537	2,0022

Esta incerteza é determinada através do coeficiente de variação (ou desvio padrão relativo) dos ensaios de repetibilidade do material volumétrico ($C_v = u_{V,rep}$).

A Tabela 6.5 apresenta os valores obtidos dos ensaios experimentais de repetibilidade anteriormente mencionados e a respetiva incerteza.

Tabela 6.5 - Valores referentes aos ensaios experimentais de repetibilidade e a respetiva incerteza.

Material Volumétrico	Volume (mL)	Média (g)	Desvio padrão	$CV = u_{V,rep}$	$u_{V,rep,rel}$
Balões	200,00	199,17	0,0291	0,0001	0,015
	50,00	49,7600	0,0091	0,0002	0,018
Pipetas	2,00	1,9995	0,0036	0,0018	0,18

Após a determinação de cada componente, a incerteza da concentração da solução da adicionada (u_{conc}) determinada através da Equação (6.14).

$$u_{conc,rel} = \sqrt{\sum u_{V,b,i,rel}^2 + \sum u_{V,rep,i,rel}^2} \quad (6.14)$$

A incerteza estimada através da Equação (6.14) é de 0,35%.

Na estimativa do componente da **incerteza do volume adicionado** (u_v), também é necessário ter em consideração tanto os erros aleatórios como os erros sistemáticos. Nesta incerteza apenas é considerado a pipeta de 2 mL, uma vez que a pipeta representa o volume adicionado na fortificação.

A incerteza do volume adicionado associada aos **erros sistemáticos** ($u_{V,b}$) também é através das informações fornecidas pelo fabricante do material volumétrico, nomeadamente o desvio máximo ou a tolerância.

Tendo em conta que a pipeta de 2 mL tem uma tolerância de 0,5 % (dados fornecidos pelo fabricante) e a distribuição é considerada retangular, a incerteza do volume adicionado associada aos erros sistemáticos determinada através da Equação (6.13) é de 0,29%.

A incerteza do volume adicionado associada aos **erros aleatórios** ($u_{V,rep}$) também é determinada através de ensaios experimentais de repetibilidade.

Tendo em conta o ensaio experimental da pipeta de 2 mL mencionado anteriormente (Tabela 6.4), a incerteza associada aos erros aleatórios é de 0,18%.

Após a determinação de cada componente, a incerteza do volume adicionado (u_v) é determinada através da Equação (6.15).

$$u_{V,rel} = \sqrt{u_{V,b,rel}^2 + u_{V,rep,rel}^2} \quad (6.15)$$

A incerteza estimada através da Equação (6.15) foi de 0,34%.

Depois da estimativa das incertezas anteriormente mencionadas, a incerteza da concentração do analito adicionado (u_{add}) é determinada através da Equação (6.16)

$$u_{add,rel} = \sqrt{u_{V,rel}^2 + u_{conc,rel}^2} \quad (6.16)$$

Na estimativa da incerteza correspondente à concentração do analito adicionado, obteve-se o valor de 0,49 %, por isso concluiu-se que esta incerteza não contribui significativamente para a incerteza do bias do laboratório e do método.

Como a incerteza do analito adicionado não influencia significativamente a incerteza do bias do laboratório e do método e a sua dimensão é inferior a 1/5 da fonte de incerteza mais elevada, esta poderia ser desprezada.

Desta forma, a incerteza associada ao bias do laboratório e do método é determinada através da Equação (6.17).

$$u_{b,rel} = \sqrt{b_{rms,rel}^2 + u_{add,rel}^2} \quad (6.17)$$

A incerteza associada ao bias do laboratório e do método tem a contribuição de 8,01%, sendo que o componente referente ao *root mean square* das recuperações contribui significativamente na estimativa desta incerteza. (ISO, 2012)

6.4 Incerteza combinada e expandida

Independentemente do tipo de abordagem utilizada, após a estimativa dos componentes de incerteza é necessário determinar a incerteza combinada. Esta incerteza consiste em combinar todas as incertezas padrão, quer sejam provenientes de fontes individuais ou de “fontes combinadas”.

Consoante o tipo de abordagem, esta incerteza pode ser determinada de diferentes formas, no entanto só irá ser abordada a estimativa da incerteza combinada a partir da abordagem supralaboratorial.

Na **abordagem supralaboratorial**, a incerteza padrão associada à reprodutibilidade intra-laboratório, u_{RW} , e ao bias do método e do laboratório, u_b , são combinadas através da Equação (6.18), se não for considerado mais nenhum componente de incerteza.

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{RW,rel}^2 + u_{b,rel}^2} \quad (6.18)$$

Uma vez que a incerteza da reprodutibilidade intra-laboratório foi de 6,32% e a incerteza do bias do método e do laboratório foi de 8,01%, obteve-se no método direto uma incerteza combinada de 10,20%.

No método com destilação obteve-se uma incerteza combinada de 10,52 %, com uma incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório de 8,06 % e uma incerteza associada ao bias do método e do laboratório de 6,75%.

Após a determinação da incerteza combinada, é determinada a incerteza expandida, em que a incerteza combinada é multiplicada por um fator de expansão (k). Este fator garante com um elevado grau de confiança (95% ou mais), que o valor medido está dentro da gama da incerteza estimada.

Normalmente, quando o número de medições é elevado, o fator de expansão é igual a 2. Mas quando o número de medições é reduzido, o fator de expansão depende do número efetivo de graus de liberdade.

Considerando que o fator de expansão é igual a 2, a incerteza expandida pode ser calculada através da Equação (6.19).

$$U_{rel} = 2 \cdot u_{c,rel} \quad (6.19)$$

Como mencionado anteriormente, na estimativa da incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório foi considerado o coeficiente de variação mais alto. No entanto, avaliou-se a influência que essa decisão teria no cálculo da incerteza expandida.

Se tivesse sido considerado o coeficiente de variação mais baixo (1,71%) no método direto, a incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório seria de 3,43% e a incerteza expandida seria de 17(,4)%. Enquanto que ao considerar o coeficiente mais alto (5,58%), a incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório seria de 6,32% e a incerteza expandida seria de 20(,4)%. Uma vez que ambas as incertezas tem a mesma ordem de grandeza, concluiu-se que considerar o coeficiente mais alto não influencia de forma significativa a incerteza expandida no método direto.

No método com destilação, também foi avaliada a influência que a utilização do coeficiente mais alto teria na determinação da incerteza expandida.

Se tivesse sido considerado o coeficiente de variação mais baixo (4,11%) no método com destilação, a incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório seria de 5,32% e a incerteza expandida seria de 17(,2)%. Enquanto que ao considerar o coeficiente mais alto (7,32%), a incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório seria de 8,06% e a incerteza expandida seria de 21(,0)%. Uma vez que ambas as incertezas tem a mesma ordem de grandeza, concluiu-se que considerar o coeficiente mais alto não influencia de forma significativa a incerteza expandida no método com destilação.

Concluindo, a incerteza expandida no método direto foi de 20% e no método com destilação foi de 21%.

Após a estimativa da incerteza expandida, avaliou-se se parâmetros de validação dos métodos e do cálculo de incertezas são aceitáveis. Esta avaliação foi efetuada comparando os coeficientes de variação obtidos no limite de quantificação, na seletividade, na sensibilidade e na precisão com a incerteza combinada obtida no método direto (10,2%) e no método com destilação (10,5%).

A incerteza expandida deve ser indicada no máximo com dois algarismos significativos. Além disso, os arredondamentos envolvidos devem ser efetuados com base nas regras gerais de arredondamentos. Mas se o laboratório quiser, os arredondamentos podem ser efetuados por excesso. (Eurachem/Citac, 2012; IPAC, 2007c; ISO, 2012)

7 CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

Qualquer laboratório com um sistema de gestão de qualidade implementado, como a AEMITEQ, tem a necessidade de minimizar e/ou controlar os erros e, assim garantir a qualidade dos resultados emitidos. Além da validação das metodologias, também é importante existir um sistema de controlo de qualidade interno. Este sistema tem como principal finalidade garantir/controlar internamente a qualidade do desempenho do método ao longo do tempo. Para tal, o laboratório deve recorrer a materiais de referência internos (MRI), técnicas adicionais de controlo de qualidade e ao tratamento estatístico de dados. Tendo em conta o método, o laboratório deve estipular a periodicidade e o tipo de ferramentas a usar. Em seguida é descrito pormenorizadamente cada ferramenta de controlo de qualidade. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a)

7.1 Curva de Calibração/Padrões de controlo

A curva de calibração representa o intervalo entre a concentração mais baixa (correspondente ao limite de quantificação) e a mais elevada, onde o método dá resultados com uma incerteza aceitável. Por isso, todas as amostras analisadas devem situar-se dentro da gama de trabalho, se tal não ocorrer esta deve ser diluída e novamente analisada.

Em relação aos padrões de controlo, estes são soluções de preparação interna (ou de fabrico) que tem uma composição semelhante às amostras analisadas. De forma a garantir a qualidade dos resultados, é essencial que os padrões sejam puros, estáveis e que sejam cumpridas as exigências referentes ao armazenamento e ao manuseamento do padrão químico. Quando um padrão é preparado pelo laboratório, deve ser evidenciado no recipiente a substância, a concentração, a data de preparação e de validade.

De forma a validar a curva de calibração, os padrões de controlo são preparados de forma independente dos padrões de calibração. A periodicidade da análise dos padrões de controlo depende na metodologia aplicada.

Quando é efetuada uma calibração analítica diária (ou em cada sessão de trabalho), é aconselhado se nada for especificado, o uso de pelo menos 1 padrão de controlo e um branco. Na metodologia em estudo é necessário efetuar uma curva de calibração por cada sessão de trabalho, uma vez que a absorvância dos padrões de calibração variam ao longo do tempo mediante as condições de trabalho.

Quando é efetuada uma calibração periódica, esta deve ser validada com, no mínimo, os dois padrões correspondentes aos limites da faixa de trabalho, em cada sessão de trabalho. Além deste critério que permite controlar o declive da reta, também deve ser conferido o valor do branco. Este tipo de calibração é utilizada quando o declive da reta é estável (estabilidade comprovada com, no mínimo, 5 calibrações) e as matrizes são conhecidas e estáveis.

A avaliação dos padrões de controlo pode ser realizada através da Equação (7.1), em que $V_{referência}$ é o valor de referência do padrão e V_{obtido} é o valor obtido experimentalmente.

$$Erro\ relativo\ (\%) = \frac{V_{obtido} - V_{referência}}{V_{referência}} \times 100 \quad (7.1)$$

Além dos critérios associados aos padrões de controlo, uma curva de calibração analítica deve ter, pelo menos 3 padrões de calibração e um branco e deve ser avaliado o declive da curva e o coeficiente de correlação.

Estas ferramentas de controlo de qualidade também podem ser controladas através de cartas de controlo, onde é possível detetar possíveis flutuações no desempenho do método ao longo do tempo. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a)

Segundo os critérios estabelecidos pelo laboratório, o declive da curva de calibração desta metodologia pode variar entre 0,48433 e 0,55240 e o coeficiente deve ser igual ou superior a 0,995. No que diz respeito aos padrões de controlo referentes ao método direto, o padrão de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L tem um critério de aceitação de 10% e o padrão de 1,00 mg NH₄⁺/L de 5%. No método com destilação, o padrão de controlo de 0,15 mgNH₄⁺/L tem um critério de aceitação de 15% e nos padrões de 0,50 mgNH₄⁺/L e 1,00 mg NH₄⁺/L o critério é de 10%. (AEMITEQ, 2014/2015c)

A Figura 7.1 apresenta o erro relativo dos padrões de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L e 1,00 mg NH₄⁺/L referentes ao método direto, determinados através da Equação (7.1). Os valores dos padrões de controlo utilizados nesta análise encontram-se no ANEXO I. Estes representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Além disso, a Figura 7.1 também apresenta os critérios de aceitação dos padrões de controlo (limite inferior e superior) do método direto.

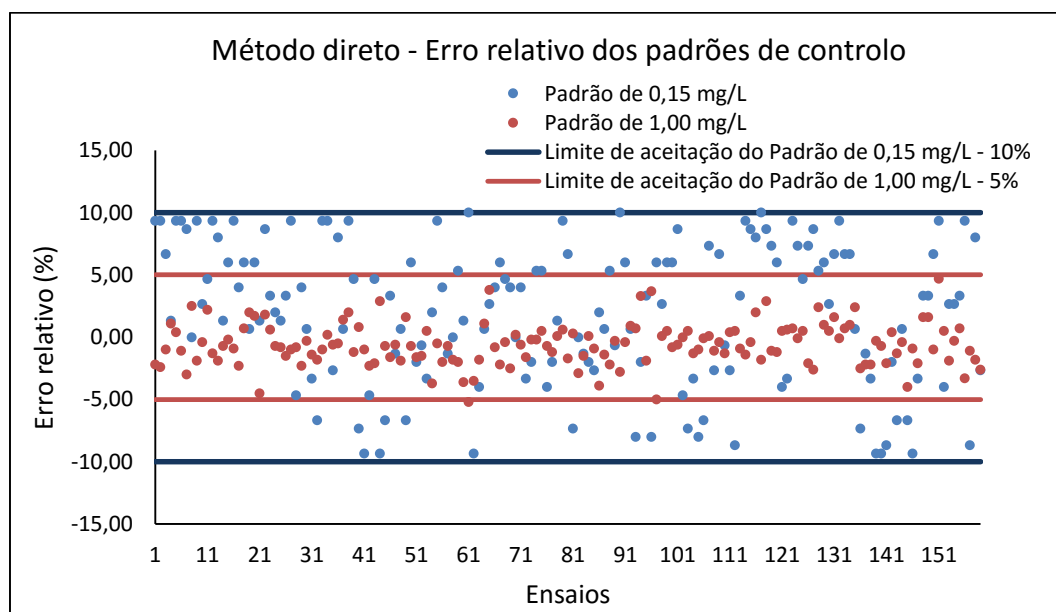


Figura 7.1 – Representação gráfica do erro relativo dos padrões de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L, e 1,00 mgNH₄⁺/L no método direto ao longo do tempo.

A Figura 7.2 apresenta os erros relativos dos padrões de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L, 0,50 mgNH₄⁺/L e 1,00 mg NH₄⁺/L referentes ao método com destilação, determinados através da Equação (7.1). Os valores dos padrões de controlo utilizados nesta análise encontram-se no ANEXO III. Estes representam análises que foram realizadas ao longo do tempo e por diferentes analistas, incluindo as análises que realizei ao longo do estágio. Além disso, a Figura 7.2 também apresenta os critérios de aceitação dos padrões de controlo (limite inferior e superior) do método com destilação.

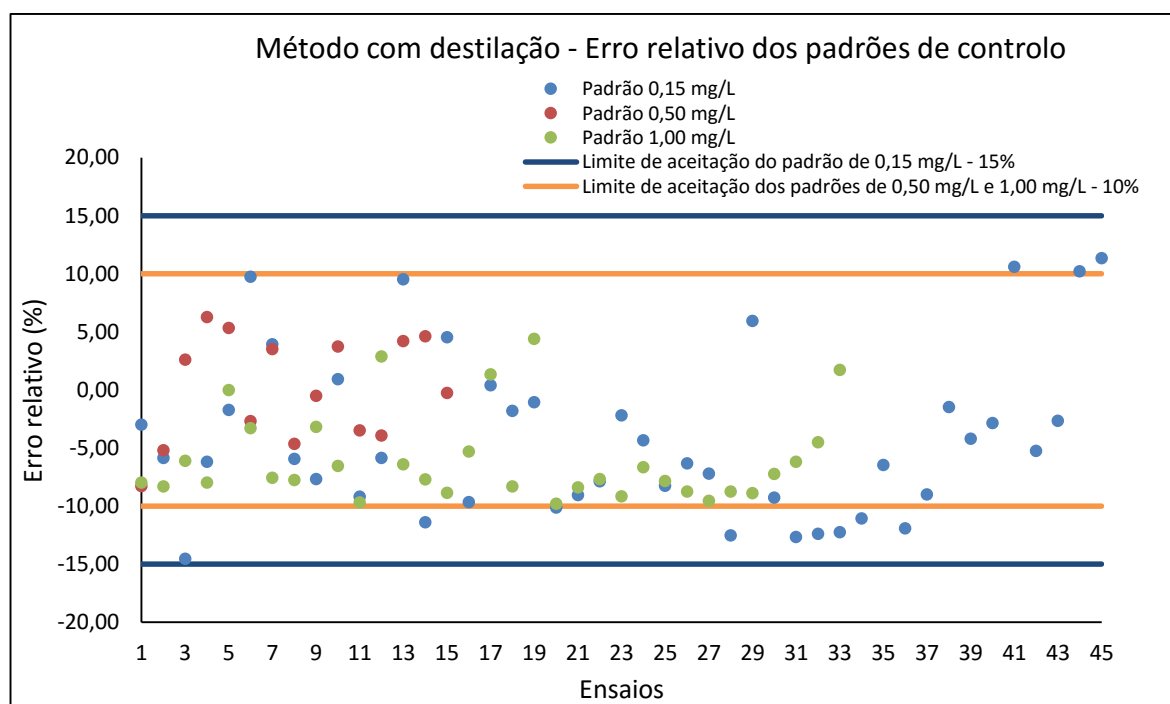


Figura 7.2 - Representação gráfica do erro relativo dos padrões de controlo 0,15 mgNH₄⁺/L, 0,50 mgNH₄⁺/L e 1,00 mgNH₄⁺/L no método com destilação ao longo do tempo.

7.2 Brancos

O branco consiste numa amostra constituída por água e os reagentes utilizados na metodologia, isto é, todos os reagentes que estão em contato com a amostra durante a análise, exceto o analito em estudo.

Este é um parâmetro muito importante no controlo de qualidade interno, uma vez que através deste é possível detetar eventuais contaminações. Quando a metodologia está mais sujeita a sofrer contaminações ou ocorra alguma alteração que influencie a análise (p.e: reagentes e materiais de lavagem), o controlo do branco deve ser mais rígido. Recomenda-se incluir um branco em cada conjunto de amostras ou em 5% do total das amostras.

No caso de se verificar alguma contaminação, deve ser averiguado a sua origem, eliminá-la e repetir todo o procedimento de medição. Também é possível controlar o branco através de cartas de controlo. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a)

Segundo os critérios estabelecidos pelo laboratório, a concentração do branco deve ser inferior a $L.Q./3,3$, ou seja, a concentração o branco deve ser inferior a 0,0455 mg/L, sendo que o sinal do branco deve ser menor ou igual que 1/3 do sinal do limite de quantificação. (AEMITEQ, 2014/2015c)

A Figura 7.3 apresenta a concentração dos brancos referentes ao método direto e ao método com destilação realizados ao longo do estágio. Os valores dos brancos utilizados encontram-se no ANEXO I e no ANEXO III. Além disso, a Figura 7.3 também apresenta o critério de aceitação do branco no método direto e no método com destilação.

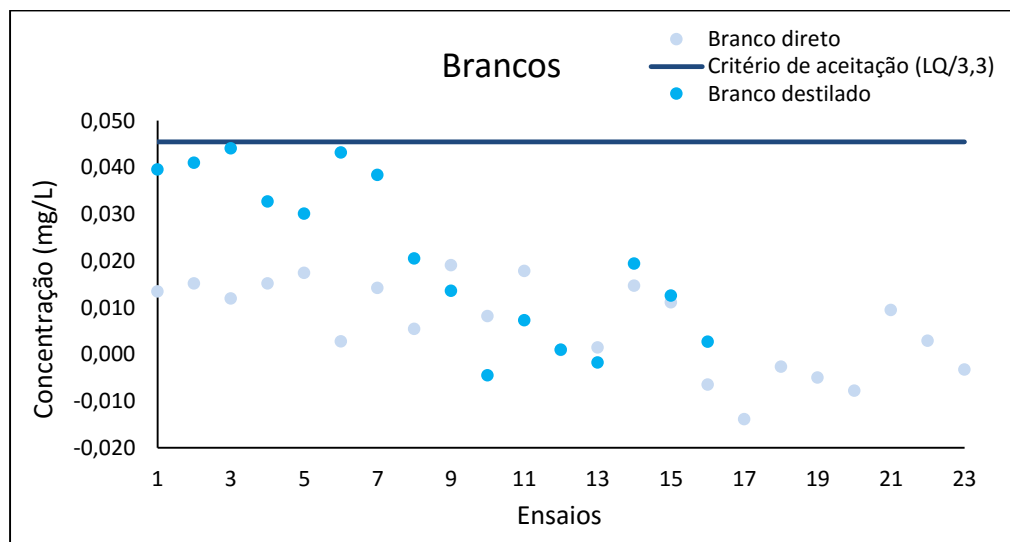


Figura 7.3- Representação gráfica do branco no método direto e no método com destilação ao longo do tempo.

7.3 Limiares Analíticos

O limiar analítico, mais precisamente o limite de deteção, normalmente é verificado uma vez por ano. No entanto, sempre que ocorra alguma modificação significativa no método, este deve ser verificado novamente e, caso seja necessário deve-se definir outro limite. Este limiar analítico deve ser determinado através de dados experimentais, em condições de precisão intermédia.

Relativamente ao limite de quantificação, este limite normalmente representa o menor padrão de uma curva de calibração e deve ser verificado em cada sessão de trabalho.

Os critérios de aceitação dos limiares analíticos encontram-se descrito de uma forma mais pormenorizada na seção sobre a validação de métodos. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a)

7.4 Duplicados

O duplicado de uma amostra é a realização de um mesmo procedimento em duas tomas diferentes da mesma amostra, com ou sem diluição.

A análise de duplicados permite detetar erros acidentais e controlar a repetibilidade. No entanto, é necessário ter em atenção à possibilidade de ocorrência de erros sistemáticos, pois estes podem não ser detetáveis na análise das amostras. Desta forma, recomenda-se no mínimo a duplicação de 5 a 10% do total das amostras.

Nos casos em que as amostras são desconhecidas, instáveis ou a metodologia é suscetível a várias fontes de incerteza, este parâmetro de controlo de qualidade interno é especialmente aconselhado. Mas, se as amostras são conhecidas e encontram-se constantemente abaixo do limite de quantificação, a frequência da análise de duplicados é reduzida (controlo anual).

Os duplicados são avaliados através da diferença relativa representado pela Equação (7.2), em que A é o resultado da amostra, D é o resultado do duplicado da amostra e \bar{X} é a média dos resultados da amostra e do duplicado.

$$D_R(\%) = \frac{|A - D|}{\bar{X}} \times 100 \quad (7.2)$$

Quando o desvio não cumpre o critério de aceitação estabelecido, deve-se repetir a análise da amostra. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a; AEMITEQ, 2014/2015c)

Na metodologia em estudo, os duplicados apresentam um critério de aceitação de 10%. (AEMITEQ, 2014/2015c)

A avaliação dos duplicados no método direto e com destilação encontra-se representado no subcapítulo 6.3.1 - Estimativa da incerteza associada à reprodutibilidade intra-laboratório.

7.5 Ensaios de Recuperação

A fortificação de uma amostra consiste na adição de uma quantidade conhecida de um analito a uma amostra. Este procedimento permite avaliar a capacidade que um método tem de recuperar o analito adicionado à amostra (idealmente seria uma recuperação de 100%) e controlar as possíveis interferências existentes.

A periodicidade da análise de ensaios de recuperação depende do tipo de amostra. Normalmente, realiza-se um ensaio em cada conjunto de amostras ou em 5% das amostras analisadas. No entanto, quando as amostras estão constantemente abaixo do limite de quantificação, os ensaios de recuperação podem ser controlados anualmente.

A percentagem de recuperação pode ser determinada através da Equação (7.3), onde C_{AF} é a concentração do analito na amostra fortificada, C_A é a concentração da amostra, C_F é a concentração da fortificação.

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{(C_{AF} - C_A)}{C_F} \times 100 \quad (7.3)$$

A determinação da percentagem de recuperação pode ser adaptada, consoante a diluição e a concentração da amostra. A diluição pode ser desprezada quando a adição do padrão corresponde a 1% ou menos do volume da amostra. Quando a concentração da amostra é inferior ao limite de quantificação, esta pode ser desprezada. Nesta situação, a percentagem de recuperação é efetuada com base na concentração da amostra fortificada e do analito adicionado.

Normalmente, o critério de aceitação dos ensaios de recuperação situa-se entre 80-120%. (Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a)

O controlo dos ensaios de recuperação da metodologia em estudo foram efetuados em cada sessão de trabalho e em matrizes diferentes. Segundo o critério estabelecido pelo laboratório, as percentagens de recuperação da metodologia em estudo devem situar-se entre os 85% e os 115%. (AEMITEQ, 2014/2015c)

A avaliação dos ensaios de recuperação encontra-se representada no subcapítulo 5.1.1 - Determinação da especificidade/seletividade do método.

7.6 Cartas de Controlo

As cartas de controlo são ferramentas muito úteis nos laboratórios, pois através destas é possível detetar eventuais situações irregulares. Normalmente, as cartas são utilizadas no controlo de equipamentos automáticos, na validação de calibrações, no controlo de precisão e exatidão de uma metodologia. A construção de cartas de controlo é efetuada com materiais estáveis e dentro do prazo de validade, nomeadamente padrões certificados, amostras duplicadas, materiais de referência certificados ou materiais de referência internos. Consoante a frequência do método em estudo, cada laboratório deve definir o procedimento de atualização.

Existem três tipos de cartas de controlo, consoante a metodologia e a necessidade de controlar determinadas características, nomeadamente as cartas de controlo de indivíduos, de amplitudes ou cumulativas.

As **Cartas de controlo de médias ou indivíduos** representam o comportamento de um determinado parâmetro ao longo do tempo.

Primeiramente, realiza-se pelo menos 10 ensaios com o intuito de determinar o valor médio e o desvio padrão. Após esta etapa primordial, a carta de controlo é construída e deve ser atualizada a cada lote de 20 análises.

De forma a controlar o parâmetro em estudo, estas cartas apresentam linhas de controlo que facilitam a deteção de pontos fora do controlo. A probabilidade de um ponto exceder a linha de controlo superior ou inferior é de 5%, enquanto que a probabilidade de exceder a linha de aviso superior ou inferior é de 0,3%. No entanto, quando se deteta variações significativas do valor médio e/ou do desvio padrão, é necessário averiguar as possíveis causas e tomar as ações corretivas necessárias.

Este tipo de cartas apresentam o formato exemplificado na Figura 7.4.

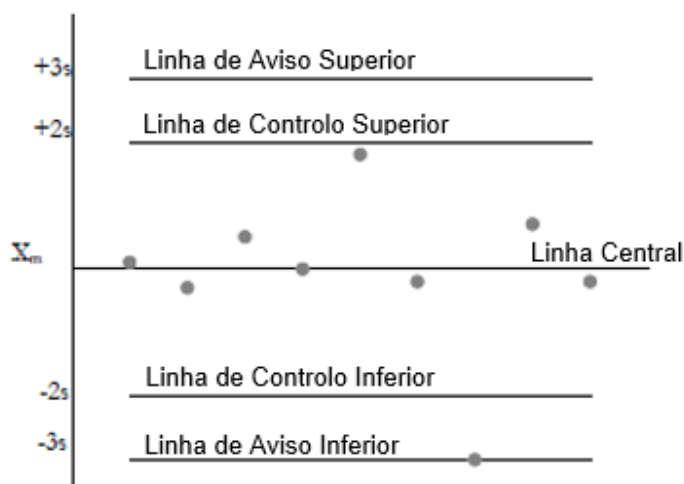


Figura 7.4 - Exemplo de uma carta de controlo de médias ou indivíduos. (adaptado de (RELACRE, 1996b))

As **Cartas de amplitudes ou de amplitudes móveis** apresentam a diferença ou a amplitude entre os valores obtidos para vários ensaios repetidos dentro de uma gama de trabalho específica.

Nesta carta de controlo, também é necessário determinar previamente o valor médio (R_m) das diferenças entre duplicados ou da amplitude, e a linha de controlo considera-se $3,27R_m$. Este tipo de cartas apresentam o formato exemplificado na Figura 7.5.

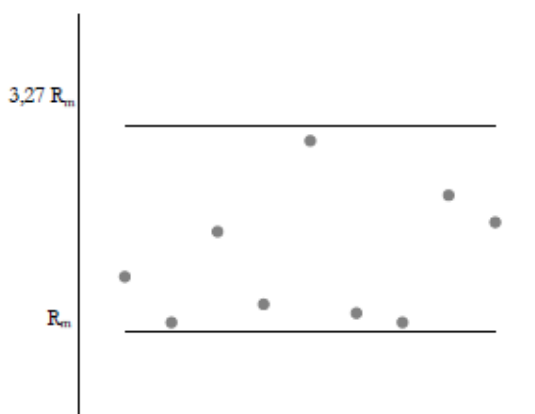


Figura 7.5 - Exemplo de uma carta de controlo de amplitudes. (RELACRE, 1996b)

As **Cartas de somas cumulativas** apresentam o somatório dos desvios em relação a um determinado valor. Neste tipo de cartas, primeiramente estabelece-se um determinado valor, por exemplo o valor de um material de referência certificado, e depois é somado continuamente os desvios observados em relação a esse valor. Uma das vantagens desta carta reside no fato de ser mais sensível em relação às restantes cartas. Desta forma, é possível detetar desvios ou tendência atempadamente.

A Figura 7.6 apresenta o formato exemplificado deste tipo de cartas. No caso de um ponto se encontrar fora da figura em “V”, como representado na Figura 7.6, este encontra-se fora do controlo e deve-se tomar as devidas ações corretivas. (AEMITEQ, 2014/2015c; Eaton, et al., 1998; RELACRE, 1996b; IPAC, 2011a; RELACRE, 1998c)

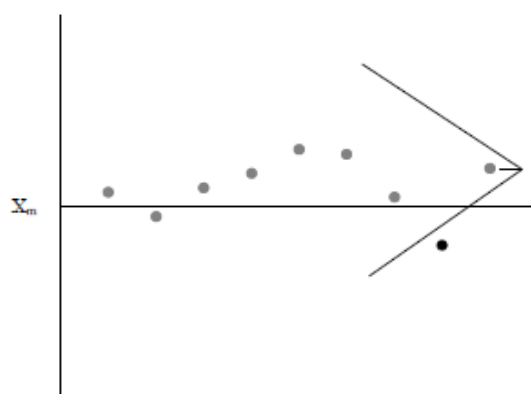


Figura 7.6 - Exemplo de uma carta de controlo de somas cumulativas. (RELACRE, 1996b)

8 OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS AO LONGO DO ESTÁGIO

Desde novembro de 2014 a julho de 2015, foram realizadas outras atividades para além da validação do método de análise do azoto amoniacal por Nesslerização e da estimativa da incerteza de acordo com a ISO 11352:2012 anteriormente descritas. As atividades realizadas durante o presente estágio no laboratório químico, incidiram também na realização de ensaios laboratoriais em águas de consumo humano, águas residuais, águas superficiais/subterrâneas e águas de processo, tanto no âmbito da acreditação como fora do âmbito da acreditação.

Inicialmente, o estágio no laboratório químico residiu no enquadramento nas atividades do laboratório, nomeadamente documentação, gestão de amostras e equipamentos. Além deste ponto primordial, o estágio consistiu na familiarização e na observação da execução das técnicas analíticas adotadas pela AEMITEQ. Posteriormente, a aprendizagem consistiu na execução das análises acompanhada e com supervisão.

Em cada metodologia, acreditada e não acreditada, realizaram-se vários procedimentos de forma a controlar a qualidade do método. Desta forma, além da análise das amostras efetuou-se o controlo de qualidade através de brancos, duplicados, fortificações, padrões de controlo e curvas de calibração, em que cada uma tinha um critério de aceitação estabelecido.

Os procedimentos experimentais seguidos na AEMITEQ quer de acordo com métodos acreditados quer segundo procedimentos fora do âmbito da acreditação, irão ser descritos de seguida de forma muito resumida, como forma de descrever esta importante componente do estágio realizado.

8.1 Métodos acreditados

No âmbito dos métodos acreditados foram analisadas por espectrofotometria de absorção molecular (UV/VIS) o azoto amoniacal, os nitritos, a cor, os cianetos e o cloro residual.

A análise de **cianetos totais** por espectrofotometria consistiu em destilar as amostras em meio ácido com o intuito de libertar os cianetos. O destilado era recebido numa solução de NaOH com o objetivo de absorver os cianetos em forma de HCN. Após a destilação, adicionou-se cloramina-T que converte os cianetos em cloreto de cianogénio (CNCl) e piridina-ácido barbitúrico que reage com o CNCl, originando uma solução corada mensurável a 578 nm.

A análise da **cor** verdadeira de uma amostra também foi realizada por espectrofotometria. Este método consiste essencialmente em determinar a cor verdadeira de uma amostra, distinguindo-a da cor aparente. A amostra era lida diretamente no espectrofotómetro a 400 nm. Quando esta apresentava uma concentração superior ao limite de quantificação, a amostra era centrifugada no sentido de averiguar a verdadeira cor da amostra e era novamente analisada.

O **azoto amoniacal** foi determinado através de dois métodos consoante a amostra em análise. Em primeira análise, realizou-se o método direto por colorimetria (nesslerização) em águas. No entanto, quando era necessário eliminar as interferências, a amostra tinha de ser destilada. Após esta etapa, a amostra era analisada pelo método colorimétrico anteriormente descrito, no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 425 nm. No âmbito do estágio efetuou-se mais de 20 análises de azoto amoniacal, em que cada análise continha em média cerca de 10 amostras. O fundamento deste método é aprofundado no subcapítulo 2.1 - Método colorimétrico – Nesslerização.

Relativamente aos **nitritos**, este analito determinou-se por colorimetria pela adição do reagente corante (4-aminobenzeno sulfonamida, dicloro-hidrato de N-(1-naftil)-1,2-etilenodiamina e ácido orto-fosfórico). Os nitritos presentes na amostra em meio ácido (pH~1,9) reagem com 4-aminobenzeno sulfonamida ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) formando um sal de diazónio. Por sua vez, este sal acopla com o dicloro-hidrato de N-(1-naftil)-1,2-etilenodiamina ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2\cdot 2\text{HCl}$) originando um composto de tonalidade rosa-vermelho que pode ser lido a um comprimento de onda de 542 nm. No âmbito do estágio efetuou-se mais de 30 análises de nitritos, em que cada análise continha em média cerca de 2 amostras.

Além dos parâmetros anteriormente mencionados, o **cloro livre** também se determinou por espectrofotometria através da adição do composto N,N-dietil-1,4-fenilenodiamina (DPD) que reage com o cloro livre presente na amostra originando um composto vermelho quando o pH se encontra entre 6,2 e 6,5 (pH garantido com uma solução tampão). Nesta mesma análise, também foi possível determinar o cloro total através da adição do DPD, da solução tampão e aproximadamente 1 g de iodeto de potássio à amostra.

No âmbito das análises de volumetria, determinaram-se a carência bioquímica de oxigénio (CBO_5), a carência química de oxigénio (CQO).

A **carência bioquímica de oxigénio** representa a quantidade de oxigénio consumido durante a degradação biológica da matéria orgânica. Esta análise consistiu em incubar uma amostra (pelo método direto ou pelo método das diluições) num frasco de Winkler durante 5 dias a 20°C. A quantidade de oxigénio dissolvido na amostra (inicial e após os 5 dias) foi determinada por titulação com uma solução de tiosulfato de sódio (e o indicador de água de amido).

A **carência química de oxigénio** representa a quantidade de oxigénio consumido durante a degradação química da matéria orgânica. Nesta metodologia, a amostra foi submetida à ebulição com um volume preciso de dicromato de potássio em meio ácido (ácido sulfúrico) que é reduzido pela matéria orgânica. Após este procedimento, o excesso de dicromato de potássio foi titulado com sulfato de ferro (II) e amónio (SFA) com a ferroína como indicador.

A determinação da **turvação** por fotometria baseia-se no princípio que o teor de turvação é proporcional à intensidade de luz dispersa pela amostra. Desta forma, a amostra foi colocada no turbidímetro e quanto maior fosse a intensidade de luz dispersa, maior seria a turvação da amostra.

A análise do **pH** foi realizada por potenciometria, onde é medida a força eletromotriz (f.e.m.) através de um eletrodo de vidro combinado. A força eletromotriz medida varia com o pH, ou seja, com a atividade dos iões de hidrogénio. A determinação deste parâmetro em águas superficiais/subterrâneas, incluindo todo o processo de controlo de qualidade, foi realizada a 25°C.

No que diz respeito à análise de **fluoreto**, esta foi efetuada por potenciometria através de um eletrodo seletivo de fluoreto, em que o seu potencial é comparado com um eletrodo de referência (eletrodo Ag/AgCl com dupla junção).

A **condutividade** foi determinada através de um condutivímetro constituído por uma sonda que determina diretamente a condutividade elétrica da amostra a 20°C e a 25°C.

Por fim, na análise de **cheiro e sabor** em águas de consumo foi realizado todo o processo de preparação de amostras e a respetiva análise de cheiro e sabor. Quando a amostra tinha cloro, era necessário antes da análise neutralizar o cloro presente na água. Na análise de cheiro e sabor, cada provador avaliava a amostra tal e qual e sem diluição, comparando-a com água de referência (água isenta de cheiro e sabor), independentemente dos outros provadores e sem conhecimento dos outros resultados. Na análise de cheiro cada provador agitava o frasco, tirava a rolha, cheirava, colocava a rolha e apontava o resultado. Na análise de sabor, cada provador transferia um determinado volume de amostra para um copo de vidro e mantinha a amostra alguns segundos dentro da boca sem engolir e depois deitava fora e apontava o resultado.

Ao longo do estágio obtive a qualificação necessária para realização análises com autonomia em vários ensaios acreditados. A qualificação das técnicas analíticas acreditadas foram realizadas ao longo do estágio em cinco etapas distintas. Este processo teve início com a familiarização dos documentos afetos aos ensaios e posterior familiarização com as metodologias, equipamentos, material e funcionamento do laboratório. A etapa seguinte consistia em realizar aos ensaios acompanhada do técnico qualificado, e na penúltima etapa realizava os ensaios com supervisão do técnico qualificado. Por último, a análise era realizada em paralelo com o supervisor, isto é, efetuavam-se ensaios de comparação. Esta última etapa tem como objetivo a qualificação técnica para a realização do ensaio acreditado. O processo de qualificação dos métodos acreditados anteriormente referidos foi realizado em 7 ensaios, nomeadamente pH, condutividade, turvação, cor, azoto amoniacal e nitritos. Uma vez que o processo de aprendizagem foi realizado com sucesso, obtive a qualificação nos ensaios referidos.

Além da qualificação anteriormente mencionada, também obtive qualificação para realizar análises de **cheiro e sabor** em águas de consumo. O processo de qualificação deste método consiste no recrutamento, seleção, treino de provadores e qualificação. Na fase de recrutamento é efetuado um questionário destinado a obter informações gerais, como por exemplo o interesse e a motivação, e tendo em conta o inquérito é efetuada a seleção dos candidatos mais aptos. Após esta fase, os candidatos realizam testes sensoriais (teste de emparelhamento, teste triangular e teste de ordenação) que permitem desenvolver a capacidade de detetar estímulos sensoriais e adquirir conhecimentos sobre as técnicas de análise sensorial. Após esta fase, procede-se à qualificação do candidato que consiste em analisar vários padrões de cheiro e sabor com diferentes diluições com o intuito de avaliar o limiar de perceção do candidato.

Além da qualificação interna dos ensaios acreditados, também foi realizado com sucesso ensaios interlaboratoriais no início do estágio, designadamente nos métodos de análise do pH, turvação, condutividade, fluoretos, cor e nitritos. (AEMITEQ, 2014/2015c)

8.2 Métodos não acreditados

Nos métodos não acreditados determinaram-se os agentes tensioativos aniónicos/detergentes, os fenóis, o fósforo, a sílica, o dióxido de carbono livre e os açúcares. Além destes métodos, também se determinou a carência bioquímica de oxigénio pelo método manométrico.

Na análise dos **agentes tensioativos aniónicos/detergentes**, o azul de metileno e os agentes tensioativos em meio alcalino formam pares iónicos corados que foram extraídos com clorofórmio. O complexo agente tensioativo aniónico-azul de metileno extraído foi adicionado a uma solução ácida de azul metileno, onde após agitação a fase orgânica foi extraída com clorofórmio. Este procedimento foi realizado três vezes consecutivas e a fase orgânica extraída foi lida a 650nm.

A análise de **fenóis** consistiu em extrair os compostos fenólicos presentes na amostra, previamente destilada, com clorofórmio. Durante a extração, os fenóis reagem com 4-aminoantipirina na presença de ferricianato de potássio originando um complexo de antipirina de tonalidade amarela. Este complexo foi posteriormente extraído com clorofórmio e lido no espectrofotómetro a 460 nm.

A determinação dos **açúcares** consistiu num método gravimétrico baseado na técnica de Munson-Walker. Neste método, a quantidade de açúcares presentes na amostra foi quantificada através do precipitado de óxido cuproso formado através da redução de cobre II. O precipitado foi filtrado e lavado com álcool etílico e éter etílico. Após este procedimento, o filtro foi seco na estufa e posteriormente pesado. A quantidade de açúcares presentes na amostra foi posteriormente obtida através das tabelas de Munson-Walker.

Relativamente à análise da **silica**, esta também foi determinada por espectrofotometria, em que era adicionado à amostra uma solução de molibdato de amónio. Este composto em meio ácido (solução de ácido clorídrico) originava um complexo silicomolíbico de tonalidade amarela mensurável a 410 nm. Com o intuito de eliminar possíveis interferências do fósforo foi também adicionado ácido oxálico à amostra.

Na determinação do **fósforo total** por espectrofotometria de absorção molecular, todo o fósforo da amostra foi convertido em ortofosfato através digestão com ácido sulfúrico e peroxodissulfato de amónio. Após este procedimento, foi adicionado à amostra uma solução com molibdato de amónio e tartarato duplo de antiamónio e potássio que reagiu com o fósforo em meio ácido. Esta reação forma um complexo de antiamónio-fosfo-molibdato que na presença de ácido ascórbico (reagente incluído na solução anteriormente mencionada) originou uma coloração azul mensurável a 880 nm. Quando se pretendia determinar apenas o ortofosfato presente na amostra, a amostra não era digerida.

O **dióxido de carbono livre** foi determinado por titulação com hidróxido de sódio por potenciometria (pH=8,3). Posteriormente, procedeu-se à padronização do NaOH com um volume da solução de $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ através de um indicador de fenolftaleína.

Além dos métodos anteriormente descritos, também foi determinado a **carência bioquímica de oxigénio pelo método manométrico**. Esta metodologia consistiu em incubar uma amostra durante 5 dias a 20°C num recipiente escuro, no qual o consumo de oxigénio foi quantificado por um sensor de pressão através da diminuição da pressão.

Uma vez que as atividades descritas foram realizadas com sucesso, é possível concluir que o estágio foi realizado com sucesso. (AEMITEQ, 2014/2015c)

9 CONCLUSÃO

O principal objetivo deste estágio que consistia em revalidar e estimar a incerteza, de acordo com a metodologia proposta na ISO 11352:2012, do procedimento analítico “Método de Análise de Azoto Amoniacal em Águas” foi cumprido com sucesso. A revalidação do método permitiu à AEMITEQ evidenciar perante o IPAC que o método permanecia validado, apesar de alteração no modo de identificação dos documentos normativos nos anexos técnicos de acreditação. Em relação à incerteza, este objetivo permitiu à AEMITEQ atualizar a estimativa de incertezas segundo a norma ISO 11352:2012. Esta etapa permitiu adquirir conhecimentos relevantes sobre a validação de um método e as diferentes formas existentes de determinar a incerteza de um método.

O enquadramento nas atividades do laboratório, nomeadamente nas atividades de documentação, gestão de amostras e do equipamento também foi um dos objetivos deste estágio que foi concluído com sucesso. Além dos objetivos anteriormente mencionados, a execução das técnicas analíticas adotadas pela AEMITEQ com supervisão, tanto no âmbito da acreditação como fora do âmbito da acreditação, foi concluída com sucesso, uma vez que adquiri diversas competências analíticas ao longo deste estágio que permitiu a qualificação em vários métodos acreditados.

De um modo geral, o estágio possibilitou o contato com um ambiente empresarial, permitindo assim aplicar e aprofundar os conhecimentos já adquiridos no ISEC mas também aprender as técnicas e as ferramentas de análise de um laboratório acreditado.

Desta forma, é possível concluir que estágio foi realizado com sucesso, tendo em conta que os objetivos estabelecidos inicialmente foram realizados com sucesso e que no final fui convidada a realizar estágio profissional na AEMITEQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washinton, D.C

AEMITEQ. 2015a. AEMITEQ. <http://www.aemiteq.pt/>.

AEMITEQ. 2014b. Manual da Qualidade. Coimbra

AEMITEQ. 2014/2015c. Procedimentos técnicos de ensaio (PTE).

ASTM. 2014. Standard Test Methods for ammonia nitrogen in water. D 1426-08, American Society for Testing and Materials. USA

Baird, Colin. 2007. Química Ambiental, 2ªEd. São Paulo : Bookman

Barwick, V J e Ellison, S L R. 2000. VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data.

Bratton, A. Calvin, Marshall, Jr., E. K. with the technical assistance of Dorothea Babbitt e Hendrickson, Alma R. 1939. A new coupling component for sulfanilamide determination. The Journal of biological chemistry, Vol. 128.

Burin, Rafael. 2006. Validação de um método analítico para determinação de cálcio e estimativa da incerteza de medição da análise de nitritos em produtos cárneos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

CETESB. 1978. Determinação de nitrogênio amoniacal em águas: Método da Nesslerização com destilação prévia: método de ensaio. São Paulo

Decreto - Lei nº 152/97. Diário da República - I série-A.139 (19-06-1997). p. 2959-2966.

Decreto - Lei nº 156/98. Diário da República - I série- A. 131 (06-06-1998). p. 2593-2598.

Decreto - Lei nº 236/98. Diário da República - I série - A. 176 (01-08 -1998). p. 2959-3722.

Decreto - Lei nº 306/2007. Diário da República, 1ª série- 164 27 Agosto de 2007. Portugal : p .5747-5765.

Eaton, Andrew D., Greenberg, Arnold E. e Clesceri, Lenore S. 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th Ed. American Public Health Association, ISBN: 0-87553-235-7.

EPA. 1974. Method 350.2 - Nitrogen, Ammonia (Colorimetric, Titrimetric, Potenciometric Distillation Procedure).

Eurachem. 2014. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. The Fitness for Purpose of Analytical Methods.

Eurachem/Citac. 2012. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 3ed. UK

Eurolab. 2002a. Eurolab Technical Report nº1/2002 - Measurement uncertainty in testing. Alemanha

Eurolab. 2006b. Eurolab Tecnicl report nº1/2006 - Guide of evaluation of measurement uncertainty for quantitative test results. França

Furtado, Patricia Bastos. 2012. Validação do parâmetro de nitrogênio amoniacal para o desenvolvimento de metodologia por cromatografia iônica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Química, Porto Alegre

IPAC. 2011a. Guia para a acreditação de laboratórios químicos.

IPAC. 2010b. Guia para aplicação da NP EN ISO/IEC 17025.

IPAC. 2007c. OGC007 - Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos. Portugal

IPQ. 2008. Vocabulário internacional de metrologia.

ISO. 2012. ISO 11352: Water quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data. Switzerland

ISO. 1990a. ISO 8466-1: Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Parte 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.

ISO. 2001b. ISO 8466-2: Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Parte 2: Calibration strategy for non-linear second order calibration functions.

Jeffery, G. H.;Basset,J, Mendham, J.;Denney, R.C.. 1989. Vogel's - Textbook of quantitative chemical analysis 5 Ed. London : Longman Scientific & Technical

Kaul, A. Gautam. 2002. Nitrogen. Water and Wastewater Analysis.

Lemos, Alice Machado, Noble, Ailne Paiva, Alexandre, Hecson Daronco, Pappis, Lauren, Nunes, Leticia Teixeira, Neves, Louise Vignoles 2009. Espectroscopia visível e ultravioleta. Universidade Federal de Santa Maria - Brasil

NP EN 26 777. 1996. Qualidade da Água. Determinação de nitritos. Método por espectrometria de absorção molecular.

Owen, Tony. 2000. Fundamentals of UV-visible spectroscopy. Germany : Argilent Technologies

Patnaik, Pradyot. 2003. Handbook and inorganic chemicals. Nova York : McGraw-Hill

Pereira, Régis da Silva. 2004. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos,Revista eletrônica de recursos hídricos

RELACRE. 2000a. Guia RELACRE 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química.

RELACRE. 1996b. Guia RELACRE 3: Validação de Resultados em Laboratórios Químicos.

RELACRE. 1998c. Guia RELACRE 9: Alguns exemplos de cartas de controlo em laboratórios de análise química.

Santos, Juracir Silva. 2007. Desenvolvimento e otimização de metodologias para a determinação de nitrogênio. Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Settle, Frank A. 1997. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey : Upper Sandle River,

Silva, Andreia de Paula e Alves, Miriam C. Carvalho. 2006. Como iniciar a validação de métodos analíticos. Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia. São Paulo, Brasil

Sommer, Lummir. 1989. Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet - The Principles. Studies in analytical chemistry, Elsvier,

WHO. 2011. Guide lines for Drinking-water Quality. Geneva: Worth Health Organization, fourth ed., ISBN 978 92 4 154815 1.

Willard, H., Merritt, Jr., L. e Dean, J. 1965. Análise Instrumental. Lisboa : Fundação Calouste Gulbenkian.

ANEXOS

ANEXO I – Dados recolhidos ao longo do tempo que foram utilizados na validação do método e na estimativa a incerteza do método direto.

Valores referentes aos padrões de controlo no método direto ao longo do tempo.

Ensaio	Padrões de Controlo		Ensaio	Padrões de Controlo (continuação)	
	0,15 mgNH ₄ ⁺ /L	1,00 mgNH ₄ ⁺ /L		0,15 mgNH ₄ ⁺ /L	1,00 mgNH ₄ ⁺ /L
1	0,164	0,978	39	0,157	0,988
2	0,164	0,976	40	0,139	1,008
3	0,160	0,990	41	0,136	0,990
4	0,152	1,011	42	0,143	0,977
5	0,164	1,004	43	0,157	0,979
6	0,164	0,989	44	0,136	1,029
7	0,163	0,970	45	0,140	0,993
8	0,150	1,025	46	0,155	0,984
9	0,164	0,981	47	0,148	0,994
10	0,154	0,996	48	0,151	0,981
11	0,157	1,022	49	0,140	1,016
12	0,164	0,987	50	0,159	0,993
13	0,162	0,981	51	0,147	0,984
14	0,152	0,993	52	0,149	0,985
15	0,159	0,998	53	0,145	1,005
16	0,164	0,991	54	0,153	0,963
17	0,156	0,977	55	0,164	0,995
18	0,159	1,007	56	0,156	0,980
19	0,151	1,020	57	0,148	0,993
20	0,159	1,017	58	0,150	0,982
21	0,152	0,955	59	0,158	0,980
22	0,163	1,018	60	0,152	0,964
23	0,155	1,006	61	0,165	0,948
24	0,153	0,993	62	0,136	0,965
25	0,152	0,992	63	0,144	0,982
26	0,155	0,985	64	0,151	1,011
27	0,164	0,990	65	0,154	1,038
28	0,143	0,992	66	0,156	0,992
29	0,156	0,977	67	0,159	0,978
30	0,151	0,997	68	0,157	0,996
31	0,145	0,986	69	0,156	0,975
32	0,140	0,982	70	0,150	1,002
33	0,164	0,990	71	0,156	0,994
34	0,164	1,002	72	0,145	0,984
35	0,146	0,994	73	0,147	0,998
36	0,162	0,995	74	0,158	0,998
37	0,151	1,014	75	0,158	1,005
38	0,164	1,020	76	0,144	0,993

Valores referentes aos padrões de controlo do método direto ao longo do tempo (continuação).

Ensaio	Padrões de Controlo (continuação)		Ensaio	Padrões de Controlo (continuação)	
	0,15 mgNH ₄ ⁺ /L	1,00 mgNH ₄ ⁺ /L		0,15 mgNH ₄ ⁺ /L	1,00 mgNH ₄ ⁺ /L
77	0,147	0,988	119	0,161	0,989
78	0,152	1,001	120	0,159	0,988
79	0,164	1,006	121	0,144	1,005
80	0,160	0,983	122	0,145	1,006
81	0,139	1,003	123	0,164	1,007
82	0,150	0,971	124	0,161	0,999
83	0,148	0,985	125	0,157	1,005
84	0,147	1,001	126	0,161	0,979
85	0,146	0,991	127	0,163	0,974
86	0,153	0,961	128	0,158	1,024
87	0,151	0,986	129	0,159	1,010
88	0,158	0,978	130	0,154	1,005
89	0,149	0,997	131	0,160	1,016
90	0,165	0,972	132	0,164	0,999
91	0,159	0,996	133	0,160	1,007
92	0,151	1,009	134	0,160	1,010
93	0,138	1,007	135	0,151	1,024
94	0,147	1,033	136	0,139	0,975
95	0,155	0,981	137	0,148	0,978
96	0,138	1,037	138	0,145	0,978
97	0,159	0,950	139	0,136	0,997
98	0,154	1,001	140	0,136	0,993
99	0,159	1,005	141	0,137	0,979
100	0,159	0,992	142	0,147	1,004
101	0,163	0,994	143	0,140	0,987
102	0,143	1,000	144	0,151	0,996
103	0,139	1,005	145	0,140	0,960
104	0,145	0,987	146	0,136	0,991
105	0,138	0,990	147	0,145	0,979
106	0,140	0,999	148	0,155	1,016
107	0,161	1,001	149	0,155	1,016
108	0,146	0,989	150	0,160	0,990
109	0,160	0,996	151	0,164	1,047
110	0,149	0,987	152	0,144	1,005
111	0,146	1,004	153	0,154	0,981
112	0,137	1,005	154	0,154	0,997
113	0,155	0,991	155	0,155	1,007
114	0,164	0,986	156	0,164	0,967
115	0,163	0,996	157	0,137	0,989
116	0,162	1,020	158	0,162	0,982
117	0,165	0,982	159	0,146	0,974
118	0,163	1,029	-	-	-

Valores referentes aos declives do método ao longo do tempo.

Ensaio	Declive	Ensaio	Declive (continuação)	Ensaio	Declive (continuação)	Ensaio	Declive (continuação)
1	0,51100	41	0,50712	81	0,52220	121	0,51435
2	0,51733	42	0,52367	82	0,52167	122	0,51493
3	0,51297	43	0,52276	83	0,53559	123	0,52518
4	0,49816	44	0,50807	84	0,53916	124	0,52477
5	0,50789	45	0,51910	85	0,50793	125	0,52470
6	0,51018	46	0,51989	86	0,51967	126	0,52542
7	0,51807	47	0,51828	87	0,52720	127	0,51537
8	0,50598	48	0,50682	88	0,53654	128	0,51294
9	0,51788	49	0,50861	89	0,53947	129	0,51130
10	0,49862	50	0,51915	90	0,54210	130	0,49713
11	0,51774	51	0,51238	91	0,54374	131	0,51320
12	0,52558	52	0,51911	92	0,52610	132	0,51405
13	0,51780	53	0,50681	93	0,53841	133	0,50680
14	0,51506	54	0,53805	94	0,49448	134	0,50794
15	0,51000	55	0,50025	95	0,49333	135	0,50831
16	0,51958	56	0,51865	96	0,52219	136	0,50282
17	0,52392	57	0,51857	97	0,53069	137	0,49768
18	0,50138	58	0,50446	98	0,52954	138	0,49142
19	0,53069	59	0,50944	99	0,52987	139	0,49348
20	0,51286	60	0,54131	100	0,51486	140	0,51250
21	0,51929	61	0,54779	101	0,51147	141	0,50939
22	0,51950	62	0,53620	102	0,51486	142	0,49333
23	0,52097	63	0,52968	103	0,51304	143	0,50173
24	0,50728	64	0,52558	104	0,50892	144	0,49592
25	0,51158	65	0,52437	105	0,52871	145	0,51326
26	0,51071	66	0,53459	106	0,50714	146	0,50143
27	0,51909	67	0,53317	107	0,51297	147	0,51295
28	0,51925	68	0,53686	108	0,50736	148	0,50739
29	0,52350	69	0,52853	109	0,50214	149	0,50765
30	0,51896	70	0,52744	110	0,51910	150	0,51597
31	0,51714	71	0,51931	111	0,51180	151	0,49794
32	0,53645	72	0,51575	112	0,49759	152	0,49808
33	0,51435	73	0,52308	113	0,51578	153	0,53146
34	0,50050	74	0,52103	114	0,51938	154	0,50498
35	0,51732	75	0,52347	115	0,52330	155	0,50518
36	0,51631	76	0,51111	116	0,51606	156	0,50146
37	0,51808	77	0,50125	117	0,52732	157	0,50314
38	0,51405	78	0,51185	118	0,52787	158	0,51658
39	0,50592	79	0,50545	119	0,50503	159	0,50238
40	0,49709	80	0,51709	120	0,51627	-	-

Valores referentes aos brancos no método direto.

Ensaio	Concentração do Branco (mg/L)
1	0,0134
2	0,0151
3	0,0119
4	0,0152
5	0,0174
6	0,0028
7	0,0142
8	0,0054
9	0,0190
10	0,0082
11	0,0179
12	0,0009
13	0,0015
14	0,0147
15	0,0111
16	-0,0065
17	-0,0139
18	-0,0026
19	-0,0049
20	-0,0078
21	0,0095
22	0,0029
23	-0,0033

Valores referentes aos duplicados das amostras no método direto.

Ensaio	Concentração dos duplicados (mg NH ₄ ⁺ /L)		Média	Desvio padrão
	Duplicado nº 1	Duplicado nº 2		
1	0,983	0,911	0,947	0,0506
2	0,913	0,894	0,904	0,0135
3	0,929	0,902	0,915	0,0188
4	0,880	0,895	0,888	0,0110
5	1,126	1,057	1,091	0,0487
6	1,074	1,029	1,052	0,0320
7	1,049	1,043	1,046	0,0045
8	0,991	0,993	0,992	0,0011
9	1,512	1,501	1,506	0,0076
10	1,457	1,485	1,471	0,0198
11	1,504	1,462	1,483	0,0297
12	0,897	0,936	0,917	0,0276
13	0,179	0,186	0,183	0,0049
14	0,691	0,691	0,691	0,0003
15	0,549	0,547	0,548	0,0014
16	0,998	1,007	1,003	0,0064
17	2,240	2,106	2,173	0,0948
18	0,661	0,694	0,677	0,0232
19	0,897	0,980	0,939	0,0587
20	0,681	0,706	0,693	0,0179
21	0,612	0,628	0,620	0,0115
22	0,676	0,657	0,667	0,0131
23	0,170	0,174	0,172	0,0029
24	0,707	0,742	0,724	0,0248
25	13,206	12,968	13,087	0,1686
26	12,912	13,192	13,052	0,1975
27	0,981	1,047	1,014	0,0470
28	0,984	1,053	1,018	0,0488

Valores referentes às fortificações do método ao longo do tempo.

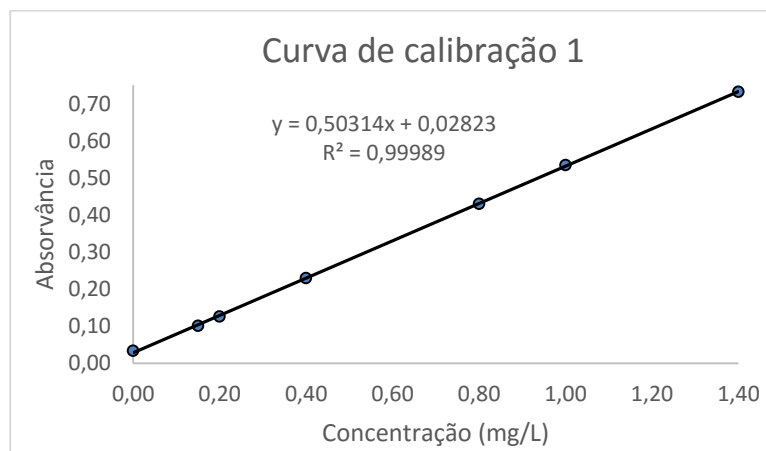
Fortificações			
Ensaio	Percentagens de Recuperação	Ensaio	Percentagens de Recuperação (continuação)
1	114,44	39	89,99
2	114,98	40	93,72
3	114,55	41	90,85
4	115,26	42	99,59
5	115,26	43	98,46
6	114,40	44	100,95
7	114,19	45	93,91
8	103,32	46	104,50
9	85,59	47	106,47
10	102,21	48	99,32
11	105,64	49	94,70
12	99,26	50	114,13
13	97,77	51	106,12
14	109,86	52	100,25
15	95,28	53	110,69
16	95,64	54	108,20
17	99,65	55	101,60
18	108,14	56	108,70
19	100,96	57	112,13
20	102,60	58	110,62
21	103,53	59	102,83
22	100,10	60	114,68
23	101,40	61	106,55
24	100,84	62	107,25
25	95,52	63	113,07
26	90,24	64	103,83
27	108,15	65	104,42
28	101,50	66	97,09
29	98,75	67	105,14
30	90,73	68	101,36
31	112,98	69	110,38
32	87,01	70	109,43
33	92,70	71	98,40
34	105,63	72	91,70
35	93,21	73	103,10
36	107,93	74	98,00
37	110,96	75	99,69
38	105,50	76	114,59

Valores referentes às fortificações do método ao longo do tempo (continuação)

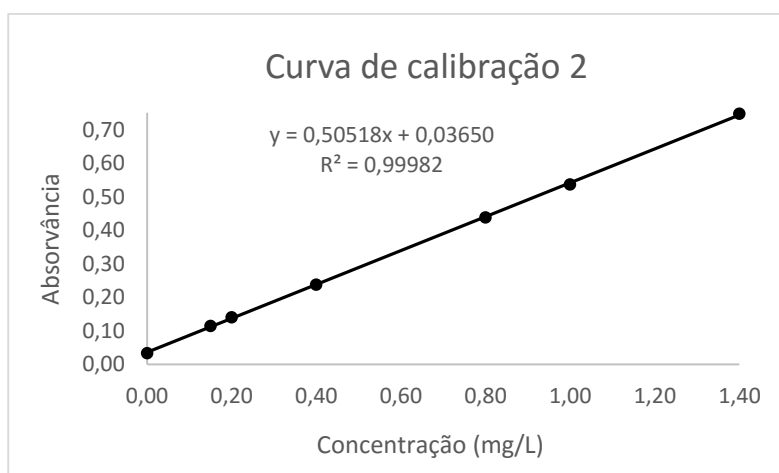
Fortificações			
Ensaio	Percentagens de Recuperação (continuação)	Ensaio	Percentagens de Recuperação (continuação)
77	109,45	115	95,47
78	102,53	116	101,03
79	99,40	117	106,18
80	106,50	118	107,70
81	91,90	119	95,86
82	114,10	120	94,58
83	114,06	121	102,83
84	101,55	122	114,16
85	109,63	123	109,48
86	102,75	124	104,72
87	107,04	125	111,93
88	105,65	126	114,04
89	108,10	127	97,48
90	92,67	128	98,79
91	103,93	129	104,21
92	112,02	130	103,30
93	101,90	131	104,79
94	102,49	132	109,12
95	105,07	133	102,26
96	99,17	134	100,75
97	103,72	135	108,65
98	96,38	-	-
99	104,47	-	-
100	107,10	-	-
101	114,71	-	-
102	103,48	-	-
103	108,49	-	-
104	108,71	-	-
105	96,50	-	-
106	104,30	-	-
107	114,30	-	-
108	94,40	-	-
109	107,88	-	-
110	109,00	-	-
111	114,20	-	-
112	109,87	-	-
113	100,20	-	-
114	112,89	-	-

ANEXO II – Curvas de calibração utilizadas na determinação do limite de quantificação.

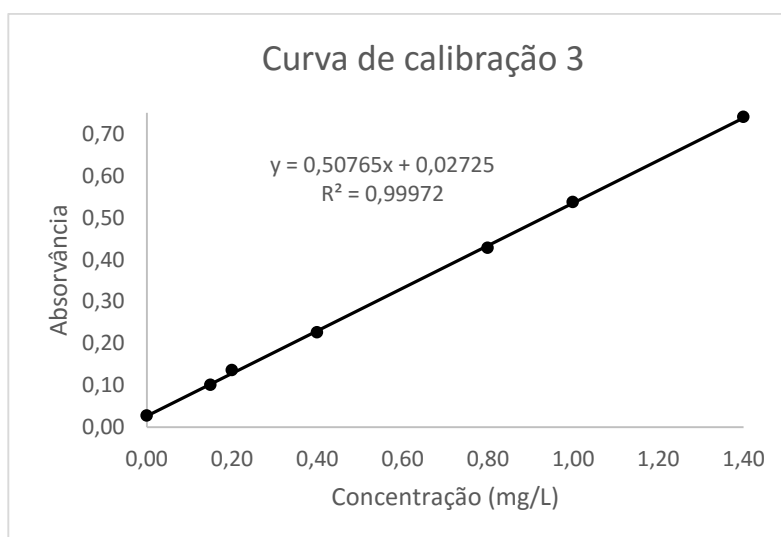
Curva de calibração nº1:

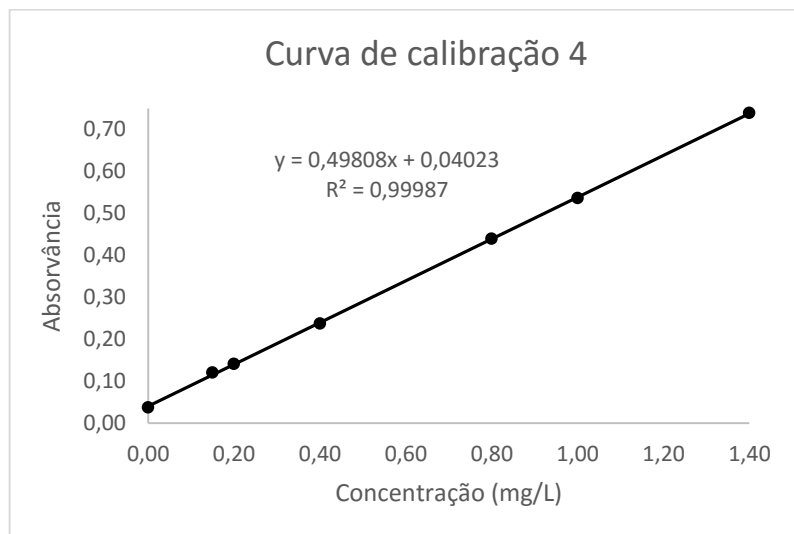
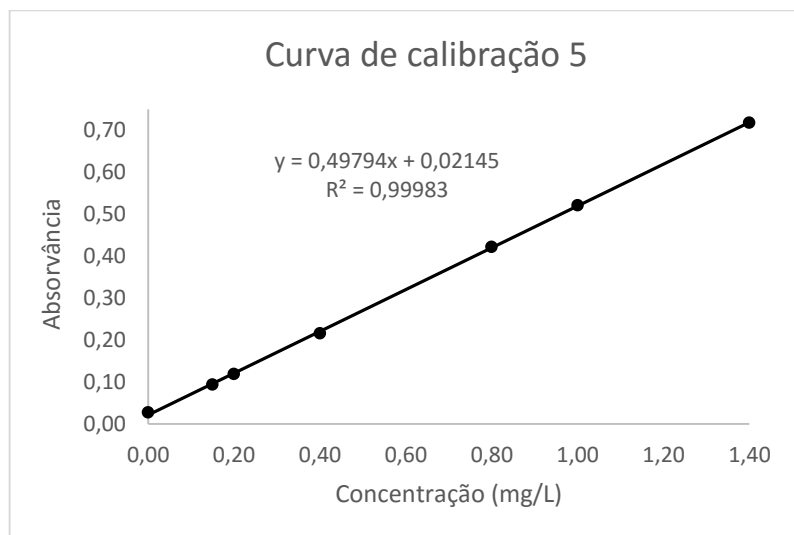
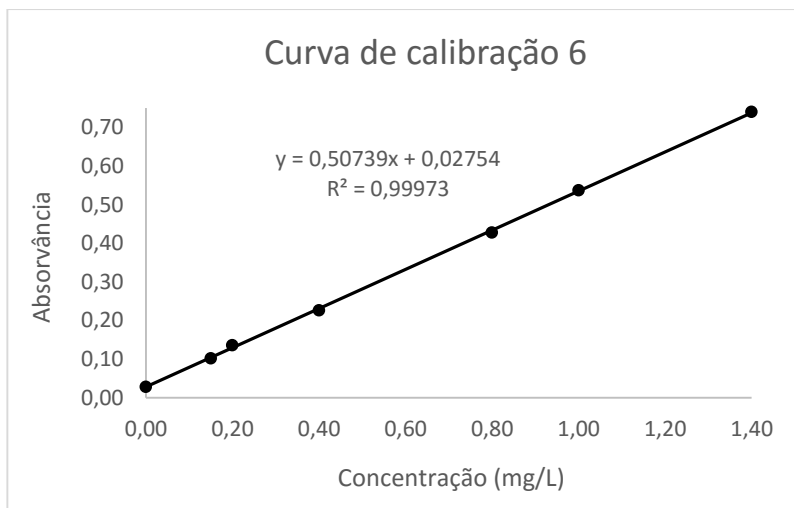


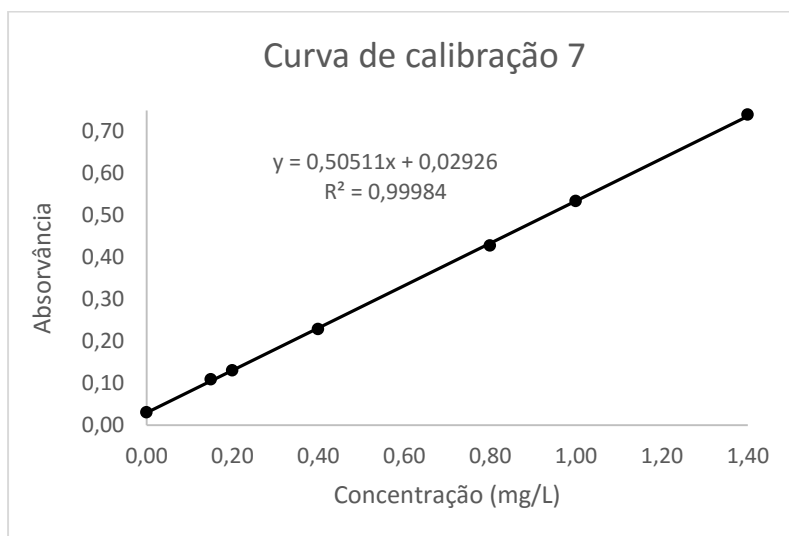
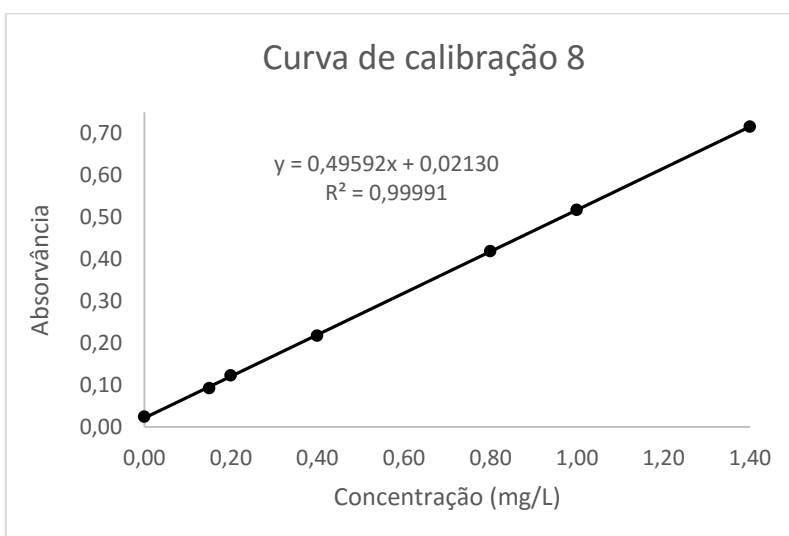
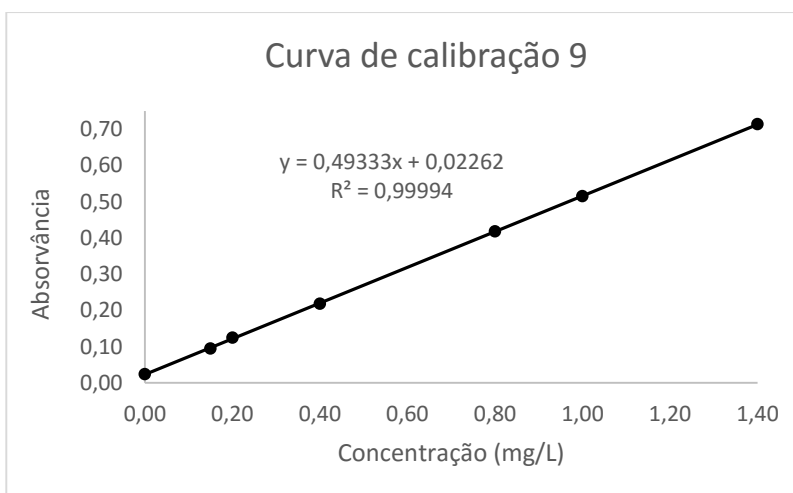
Curva de calibração nº2:

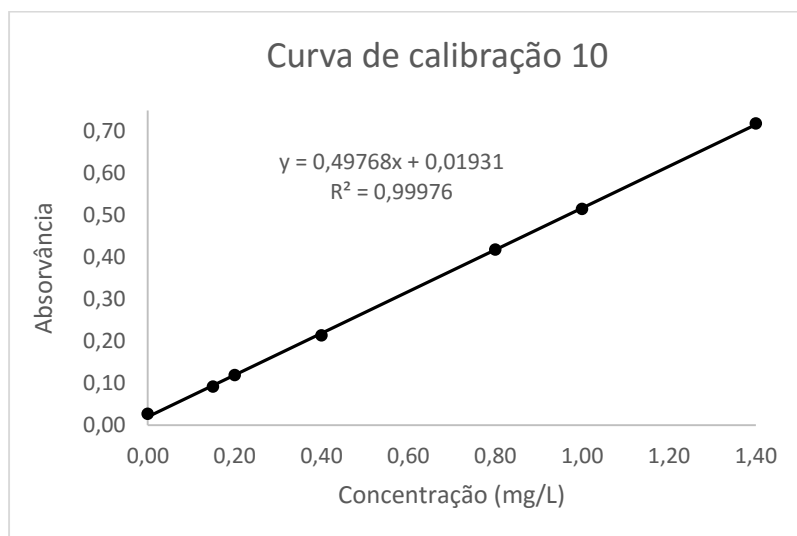


Curva de calibração nº3:



Curva de calibração nº4:**Curva de calibração nº5:****Curva de calibração nº6:**

Curva de calibração nº7:**Curva de calibração nº8:****Curva de calibração nº9:**

Curva de calibração nº10:

ANEXO III – Dados recolhidos ao longo do tempo que foram utilizados na validação do método e na estimativa da incerteza do método com destilação.

Valores referentes aos padrões de controlo no método com destilação.

Padrões de Controlo							
Ensaio	0,15 mg NH ₄ ⁺ /L	Ensaio	0,15 mg NH ₄ ⁺ /L (continuação)	Ensaio	0,50 mg NH ₄ ⁺ /L	Ensaio	1,00 mg NH ₄ ⁺ /L
1	0,146	34	0,133	1	0,459	1	0,920
2	0,141	35	0,140	2	0,474	2	0,917
3	0,128	36	0,132	3	0,513	3	0,939
4	0,141	37	0,137	4	0,531	4	0,920
5	0,147	38	0,148	5	0,527	5	1,000
6	0,165	39	0,144	6	0,487	6	0,967
7	0,156	40	0,146	7	0,518	7	0,924
8	0,141	41	0,166	8	0,477	8	0,922
9	0,139	42	0,142	9	0,497	9	0,968
10	0,151	43	0,146	10	0,519	10	0,934
11	0,136	44	0,165	11	0,483	11	0,903
12	0,141	45	0,167	12	0,480	12	1,029
13	0,164	-	-	13	0,521	13	0,936
14	0,133	-	-	14	0,523	14	0,923
15	0,157	-	-	15	0,499	15	0,911
16	0,136	-	-	-	-	16	0,947
17	0,151	-	-	-	-	17	1,013
18	0,147	-	-	-	-	18	0,917
19	0,148	-	-	-	-	19	1,044
20	0,135	-	-	-	-	20	0,902
21	0,136	-	-	-	-	21	0,916
22	0,138	-	-	-	-	22	0,923
23	0,147	-	-	-	-	23	0,908
24	0,144	-	-	-	-	24	0,934
25	0,138	-	-	-	-	25	0,922
26	0,141	-	-	-	-	26	0,912
27	0,139	-	-	-	-	27	0,905
28	0,131	-	-	-	-	28	0,913
29	0,159	-	-	-	-	29	0,911
30	0,136	-	-	-	-	30	0,928
31	0,131	-	-	-	-	31	0,938
32	0,131	-	-	-	-	32	0,955
33	0,132	-	-	-	-	33	1,017

Valores referentes aos brancos no método com destilação.

Ensaio	Concentração do Branco (mg/L)
1	0,0396
2	0,0410
3	0,0441
4	0,0327
5	0,0301
6	0,0432
7	0,0384
8	0,0205
9	0,0136
10	-0,0045
11	0,0073
12	0,0010
13	-0,0018
14	0,0194
15	0,0126
16	0,0027

Valores referentes aos duplicados das amostras no método com destilação.

Ensaio	Concentração dos duplicados (mg NH ₄ ⁺ /L)		Média	Desvio padrão
	Duplicado nº1	Duplicado nº2		
1	0,192	0,188	0,190	0,0028
2	13,754	13,887	13,821	0,0940
3	59,000	60,610	59,805	1,1384
4	33,017	32,989	33,003	0,0198
5	0,197	0,181	0,189	0,0113
6	2,732	2,884	2,808	0,1075
7	1,240	1,234	1,237	0,0042
8	41,556	43,760	42,658	1,5585
9	10,581	10,198	10,390	0,2708
10	40,624	37,775	39,200	2,0145
11	0,204	0,209	0,207	0,0035
12	21,569	23,202	22,386	1,1547
13	21,521	22,046	21,784	0,3712
14	51,580	55,559	53,570	2,8136
15	26,378	29,030	27,704	1,8752
16	95,785	103,629	99,707	5,5465
17	1,839	1,995	1,917	0,1103
18	110,452	112,087	111,270	1,1561
19	3,571	3,595	3,583	0,0170
20	17,079	17,278	17,179	0,1407
21	0,231	0,216	0,224	0,0106
22	122,497	118,303	120,400	2,9656
23	140,484	136,513	138,499	2,8079
24	0,385	0,409	0,397	0,0170
25	22,919	23,348	23,134	0,3033
26	135,107	138,814	136,961	2,6212
27	2,807	2,819	2,813	0,0085
28	37,017	39,779	38,398	1,9530
29	0,455	0,472	0,464	0,0120
30	127,530	128,473	128,002	0,6668
31	12,542	12,638	12,590	0,0679
32	70,580	74,366	72,473	2,6771
33	122,445	121,875	122,160	0,4031
34	12,826	12,561	12,694	0,1874
35	149,572	155,431	152,502	4,1429
36	36,054	38,246	37,150	1,5500
37	169,149	172,944	171,047	2,6835